

**Doble Grado en Ciencias del Mar y Ciencias Ambientales**

**Estudio de una población  
fitoplanctónica marina mixta  
sometida a estrés por contaminantes**



**Trabajo de Fin de Grado**

Curso: 2020/2021

Puerto Real, Cádiz. 15-06-2021

Tutores: Ana Bartual Magro e Ignacio Moreno Garrido

## Agradecimientos

En primer lugar, quería agradecer la tremenda ayuda a mis dos tutores, Ana Bartual Magro y Nacho Moreno Garrido, sin los que este trabajo no podría haber salido adelante y que me han dado tan buenos consejos y me han enseñado tanto durante este año y en las situaciones excepcionales en las que nos encontramos.

En especial, quería agradecer a mis padres todo el apoyo durante estos seis años, emocional, de llamadas, consejos, viajes para arriba y para abajo para vernos cuando se pudiera y sobre todo por creer en mí y darme todo lo que han podido y más para que yo cumpliera lo que ha sido el primer paso de esta pequeña aventura/sueño. A mis hermanos por apoyarme siempre, aunque sea la hermana perdida fuera de Madrid y a los que tanto he echado de menos porque siempre venían a molestarme mientras estudiaba y así yo, pues de paso descansaba, y en general a toda la familia, que me han enseñado que la distancia es solo un número de km, pero tu familia siempre va a estar ahí.

Como olvidarme de todos los amigos que he hecho durante la carrera, compañeros de piso, con los que he podido compartir momentos de estrés, de risas, de lloros, de consejos... en fin, lo que es la universidad, y estoy agradecida de haberme encontrado con ellos en el camino.

En especial quería dar las gracias a Pau, mi mentor, que también me ha ayudado a nivel personal y académico, a Carmen mi mejor amiga a la que me llevo siempre conmigo y a Álvaro ese chico que me ha apoyado tanto y espero que lo siga haciendo toda la vida (y a su perrito Bao).

Finalizando, a todas las personas que durante estos 6 años me han enseñado a que la universidad ha sido una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida, y de la que no me voy a arrepentir nunca.

Muchas gracias a todos.

Os quiero mucho.

# Índice

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
OBJETIVOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
1. Material biológico .....	8
2. Selección de los contaminantes y sus concentraciones .....	10
3. Diseño experimental .....	12
3.1. Mantenimiento de los cultivos stocks .....	12
3.2. Preparación de los cultivos experimentales .....	12
3.3. Ensayo de toxicidad .....	14
4. Cálculos realizados .....	15
4.1. Tasas de crecimiento .....	15
4.2. Porcentaje de inhibición .....	16
4.3. Tratamiento de datos y estadística .....	16
RESULTADOS .....	17
I. Tasas de crecimiento .....	17
II. Porcentajes de inhibición .....	21
DISCUSIÓN .....	24
RECOMENDACIONES .....	33
CONCLUSIONES .....	34
BIBLIOGRAFÍA .....	35
ANEXOS .....	46
Anexo I .....	46
Anexo II .....	47
Anexo III .....	48
Anexo IV .....	50

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar las posibles relaciones de competencia existentes entre cuatro especies fitoplanctónicas que coexisten naturalmente en el medio marino costero, en respuesta a una situación de estrés tóxico. Para ello, se seleccionaron tres especies microalgales (*Rhodomonas baltica*, Cryptophyta; *Amphidinium carterae*, Dinophyta y *Phaeodactylum tricornutum*, Bacillariophyta) y una cianobacteria (*Synechococcus sp.*). El estrés tóxico fue inducido por la adición de contaminantes, siendo tres de ellos contaminantes emergentes: cafeína, ciprofloxacina (antibiótico) y nanopartículas de plata (NPsAg), y también se utilizaron aldehídos poliinsaturados (PUAs), cobre (Cu) y cadmio (Cd). El diseño experimental consistió en evaluar el crecimiento de las especies durante 72 h de exposición a los mismos, realizando el seguimiento de la densidad celular en cultivos experimentales, con las cuatro especies mezcladas. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h de la adición de los tóxicos que se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados mostraron claras diferencias en la respuesta de las distintas especies ante los contaminantes. Así, *Synechococcus sp.* mostró una disminución de las tasas de crecimiento, cuyos efectos más significativos fueron debidos a la ciprofloxacina y las NPsAg, ( $1.164 \pm 0.007 \text{ día}^{-1}$ , se redujo hasta  $0.275 \pm 0.101 \text{ día}^{-1}$  y desde  $1.176 \pm 0.016 \text{ día}^{-1}$  hasta  $0.273 \pm 0.063 \text{ día}^{-1}$ ). También, destacó el porcentaje de inhibición de la población de cianobacterias debido a las NPsAg que alcanzó un  $91.5 \pm 2.9 \%$  y a la ciprofloxacina que llegó hasta un  $87.4 \pm 3.8 \%$ . Estas nanopartículas también tuvieron un gran efecto de inhibición para *A. carterae*, inhibiendo su crecimiento en un  $98.4 \pm 6.2 \%$ , al contrario que con la ciprofloxacina, que hizo que aumentara su crecimiento en un  $50 \pm 6.6 \%$ . En cuanto a *P. tricornutum*, es la que tiene los porcentajes de inhibición más bajos, aunque, de todas las especies, *R. baltica* fue la especie menos afectada por la presencia de estos contaminantes. De los resultados obtenidos, se puede concluir que *R. baltica* fue la especie que mejor se adaptó ante posibles entradas de estos contaminantes en el medio natural, siendo la cianobacteria la que mostró un efecto más negativo en competencia con el resto de especies en una situación de contaminación.

Palabras clave: fitoplancton, citometría, contaminantes emergentes, competencia.

## ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the possible existing competition relationships between four phytoplankton species that naturally coexist in the coastal marine environment, in response to a situation of toxic stress. There was a selection of three species of microalgae, which are: *Rhodomonas baltica* (Cryptophyta), *Amphidinium carterae* (Dinophyta) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) and one cyanobacterium, *Synechococcus sp.* Toxic stress was induced by the addition of pollutants, five of them emerging pollutants: caffeine, ciprofloxacin (antibiotic), copper, cadmium, and silver nanoparticles (NPsAg), and polyunsaturated aldehydes (PUAs) were also used. The experimental design, consisted on evaluating the growth of the species during 72 h of exposure to them, monitoring the cell density in experimental cultures, with these four species mixed. Samples were taken 24, 48 and 72 h after the addition of toxins and analyzed by flow cytometry.

The results showed clear differences in the response of the different species to pollutants. Thus, *Synechococcus sp.* showed a decrease in growth rates, whose most significant effects were due to ciprofloxacin and NPsAg, which respectively reduced its growth rate from  $1.164 \pm 0.007 \text{ day}^{-1}$  to  $0.275 \pm 0.101 \text{ day}^{-1}$  and from  $1.176 \pm 0.016 \text{ day}^{-1}$  to  $0.273 \pm 0.063 \text{ day}^{-1}$ . Also, the percentage of inhibition due to cyanobacteria due to NPsAg reached  $91.5 \pm 2.9 \%$  and due to ciprofloxacin reached  $87.4 \pm 3.8\%$ , were highlighted. These nanoparticles also had a great inhibition effect for *A. carterae*, inhibiting its growth by  $98.4 \pm 6.2\%$ , unlike with ciprofloxacin, which increased its growth by  $50 \pm 6.6\%$ . Regarding *P. tricornutum*, it is the one with the lowest percentages of inhibition, although, of all the species, *R. baltica* was the least affected species. From the results obtained, it can be concluded that *R. baltica* was the species that has the best adaptability to possible entry of these pollutants into the natural environment, being cyanobacteria the one that showed more negative effects in competition with the rest of species in a situation of contamination, and this may be due to various causes such as the presence of pollutants, interspecific relationships between species and the relationship between these two factors.

Key words: phytoplankton, cytometry, emerging pollutants, competency.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos fitoplanctónicos son la parte autótrofa de la comunidad planctónica, formada por cianobacterias y microalgas. Estos organismos captan la luz en la zona fótica de la columna de agua para realizar el 45 % del total de la fotosíntesis que ocurre en la Tierra. Entre sus funciones, destaca el mantenimiento los ciclos naturales de nutrientes como el carbono, el nitrógeno o el fósforo (Falkowski, 1994; Paerl, *et al.*, 2018; You, *et al.*, 2021). Son así los principales productores primarios, siendo en concreto el fitoplancton oceánico responsable de la mayor producción primaria neta global (Ruoco, 2011; Anfuso, *et al.*, 2013). Las cianobacterias del género *Synechococcus*, son las que contribuyen de una manera más significativa a la biomasa de la comunidad fitoplanctónica acuática, ya que son responsables del 80-90 % del total del carbono producido en los hábitats acuáticos (Sliwinska, *et al.*, 2017). Los organismos fitoplanctónicos son pues, la base de las redes tróficas pelágicas, jugando así un importante papel en el equilibrio ecológico de los ecosistemas acuáticos (Ruoco Molina, 2011). Junto con las cianobacterias, los dos grupos fitoplanctónicos costeros más abundantes son las diatomeas (Div. Bacillariophyta) y los dinoflagelados (Div. Dinophyta), seguidos de las haptófitas. Las diatomeas pueden alcanzar una abundancia en áreas costeras de hasta el 40% del fitoplancton total y gracias a su diversidad, su gran aporte a la producción neta y sus múltiples formas, son el grupo autótrofo con más dominancia del ambiente pelágico. Los Dinoflagelados pueden alcanzar en ciertas épocas del año una abundancia también elevada, ocupando el segundo lugar en diversidad y en el aporte a la producción neta. Destacan también las Haptophytas que son aproximadamente un 10% del fitoplancton costero total, y entre ellas destacan los cocolitofóridos (Hernández Becerril, 2014), además de tener entre 60 (Sournia, *et al.*, 1995) y 200 especies de cryptophytas (Kooistra, *et al.*, 2007). En las últimas décadas, ha habido un aumento de la contaminación en las zonas costeras del medio marino, debido a actividades antropogénicas. Entre otras muchas, el desarrollo que más destaca es el de las industrias farmacéutica, que crean fármacos con compuestos activos (PhAHs), y la industria alimentaria (Navarro y Suárez, 2019). Además, ha aumentado el uso de los PPCPs o productos de cuidado personal y fármacos (Richmond, *et al.*, 2017), que como la cafeína y la ciprofloxacina (ambos objetivos de este estudio), pueden llegar a ser de uso diario, y es bien conocido el mayor uso de plásticos, productos textiles, perfumes, teflón (Garrido, *et al.*, 2016; Biel, *et al.*, 2018), herbicidas, PAHs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) o

metales pesados (Tukaj & Tukaj, 2009; Echeveste, *et al.*, 2011) entre otros. Algunos de los anteriores, forman parte de los que se conocen como “Contaminantes de Interés Emergente” o CECs (*Contaminant of Emerging Concern*), definidos en el año 2008 por La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA), como aquellos contaminantes que actualmente no están regulados, ni tienen un control de seguimiento y que son candidatos para que se regulen en un futuro dependiendo de su ecotoxicidad, efectos potenciales en la salud y frecuencia con la que se encuentran en el medio ambiente (US-EPA, 2008). Más de 80 compuestos pertenecientes a los CECs, han sido encontrados en investigaciones realizadas en varias partes del mundo como Austria, Brasil, Canadá, Croacia, España, etc. (Greenwood, 2007). En Europa, con la intención de intentar paliar el efecto que estos contaminantes pueden tener en el medio marino, la Comisión Europea tuvo una iniciativa en el año 2005, con un proyecto denominado “NORMAN”. Este proyecto recopila información sobre los CECs y la hace accesible a todos los organismos que la necesiten. Conformar una base de datos que ordena los miles de posibles CECs, seleccionando cuáles de estos pasarán a la lista de CECs de una manera definitiva. También dentro de NORMAN se desarrolló un protocolo para que cualquiera que accediera a la base de datos, supiera qué pasos habría que seguir en presencia de un CEC (Dulio, *et al.*, 2018). Después en 2015, la Comisión de Implementación de Decisiones de la Unión Europea (*Comission Implementing Decision (EU)*), como parte de la Comisión Europea, creó la denominada “*Watch List*” o lista de vigilancia (*Anexo I*). Esta lista incluye los nombres de los CECs que se consideran necesarios para tener un control, pudiendo añadir o eliminar sustancias, según el grado de conocimiento y seguimiento que haya de las mismas y que se actualiza cada dos años. Estas actualizaciones las realizan un grupo de investigadores con el objetivo final de redactar un informe que se publica en el *JRC Publications Repository (Joint Research Centre’s publications)*, en el que se sugieren una serie de cambios respecto a la *Watch List* anterior. Es entonces, cuando la Comisión de Implementación de Decisiones de la Unión Europea, toma la decisión de aprobar o no el informe realizado, y, en caso afirmativo, que entre en vigor dentro de los territorios de la UE (European Comission, EU Science Hub, 2018). En la última actualización publicada en 2018, únicamente se añadieron dos antibióticos: ciprofloxacina y amoxicilina, con unos máximos aceptables en el medio acuático de 89 y 78 ng/L, respectivamente (European Comission, EU Science Hub, 2018). La regulación de los CECs es complicada y escasa, sobre todo por la falta de medios de detección de concentraciones del orden de ng/L. Debido a esto, la mayoría de CECs no están incluidos en normativas

reguladoras, ni a nivel europeo, ni estatal, y aunque se sepa que existen, siguen siendo una posible amenaza para el medio ambiente (Cuenca Rompinelli, 2019).

Un ejemplo de contaminantes emergentes actuales son algunos compuestos que contienen las cremas solares. Aproximadamente un 54 % de la población mundial, es decir, más de la mitad, vive en áreas costeras (Tovar Sánchez, *et al.*, 2013; Peña Guzmán, *et al.*, 2019) y el uso de cremas solares, aumenta en las horas punta de radiación solar en la época de verano, entre las 14:00 y las 18:00 de la tarde (Tovar Sánchez, *et al.*, 2013). Este hecho hace, que las cremas solares sean un producto de consumo diario que está creciendo a escala global. Estos productos contienen compuestos de origen orgánico que absorben la radiación solar UV y también compuestos inorgánicos que actúan como filtros químicos de radiación UV ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ ) que tienen efectos negativos en el ecosistema marino costero y pueden favorecer las tasas de crecimiento de algunas especies fitoplanctónicas, mientras que otras en desventaja, se vean inhibidas (Tovar Sánchez, *et al.*, 2013). También al diluirse en el agua de mar, liberan nutrientes inorgánicos como P, N y Si. Estos compuestos forman una película en la superficie que puede alterar el ecosistema marino. Por ejemplo, está demostrado que el P induce una respuesta de fitoplancton durante los meses de verano en el mar Mediterráneo. Para una crema solar que contenga hasta una concentración de  $17 \mu\text{mol/g}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  y teniendo en cuenta una dosis normal recomendada para una persona adulta,  $36 \text{ g}$  ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ), la cantidad de  $\text{PO}_4^{3-}$  puede llegar a aumentar un 55% su concentración habitual, es decir, el doble. Este hecho puede provocar, que, por la presencia de nutrientes esenciales haya un exceso de crecimiento de diatomeas que se vean favorecidas, llegando a producir un *bloom* e inhibiendo el crecimiento de otras especies más vulnerables a cierto tipo de contaminantes.

Hay estudios que demuestran, que la presencia de contaminantes y el estrés que estos provocan a las comunidades fitoplanctónicas, puede inducir a que alguna especie cree una resistencia a los mismos, sustituyendo así a las especies más sensibles (You, *et al.*, 2021). Blanck, *et al.*, (1988), propuso por primera vez, un nuevo término ecotoxicológico para definir la tolerancia de las comunidades de fitoplancton a los contaminantes debido a una exposición crónica, la “tolerancia de una comunidad inducida por contaminantes” (Pollution-Induced Community Tolerance, PICT), ya que las algas que nunca han estado expuestas a un estrés por contaminantes no parecen desarrollar ningún mecanismo de tolerancia (Bérard & Benninghoff, 2001). Como respuesta a la desventaja ecológica que tienen las especies más vulnerables frente a esta resistencia inducida, estas últimas han sido



capaces de desarrollar otro tipo de adaptaciones. Por ejemplo, las diatomeas por lo general, son capaces de producir unas oxilipinas que son los aldehídos poliinsaturados o PUAs (Miralto, *et al.*, 1999). Estos compuestos proceden de la lipoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs cuando una célula se ve dañada (por ejemplo, por depredación de organismos superiores de la cadena trófica como los copépodos). La respuesta a esta depredación es oxidar rápidamente los PUFAs y segundos después producen los PUAs. Se ha estimado que cada célula de diatomea es capaz de librar una cantidad de este compuesto orgánico de 46.9, 4.7 y 0.5  $\mu\text{mol/PUA}$  que alcanza una distancia de 1, 10 y 100  $\mu\text{m}$  alrededor de la célula y, por lo tanto, puede perjudicar a los organismos que se encuentren cerca (Ianora & Miralto, 2010). Otras adaptaciones pueden ser la migración o las capacidades mixótrofas, características presentes en algunas especies de Cryptophytas como *R. baltica* y de dinoflagelados como *A. carterae*, que les ayudará a mejorar su competencia interespecífica (Smayda, 1997).

Estas capacidades de adaptación y de competencia interespecífica, se pueden ver afectadas por la presencia de contaminantes que sean más perjudiciales para un grupo de fitoplancton en concreto. Por lo tanto, los contaminantes pueden ser un factor de estrés decisivo en las densidades poblacionales de estos organismos fitoplanctónicos, que pueden llegar a cambiar las dinámicas poblacionales, dando lugar, por su presencia, por ejemplo, a afloraciones de ciertas especies que se vean favorecidas frente a otras especies más sensibles.

En este estudio se ha querido comprobar el efecto que diversos contaminantes tipo puedan tener en una comunidad fitoplanctónica mixta constituida por cuatro especies pertenecientes a distintos grupos fitoplanctónicos que suelen coexistir en el medio natural (*Rhodomonas baltica*, *Amphidinium carterae*, *Phaeodactylum tricornutum* y la cianobacteria *Synechococcus sp.*). Se han empleado como contaminantes aldehídos poliinsaturados (PUAs), cobre (Cu) y cadmio (Cd) además de tres contaminantes emergentes: cafeína, ciprofloxacina (antibiótico) y nanopartículas de plata (NPsAg). El objetivo general de este trabajo ha sido analizar el efecto que los contaminantes anteriormente mencionados, tienen sobre el crecimiento de cada una de las especies fitoplanctónicas seleccionadas en un cultivo mixto.

## OBJETIVOS

En este trabajo de fin de grado, se ha considerado conveniente hacer una distinción entre los objetivos que el estudio tiene para la orientación de Ciencias del Mar y, por otro lado, para la de Ciencias Ambientales, ya que, se realiza una memoria conjunta, en la que se podrán evaluar los conocimientos adquiridos en ambas disciplinas. Por lo tanto, el objetivo general para el Grado de Ciencias del Mar ha sido:

- Realizar desde un punto de vista ecológico una mezcla representativa de la comunidad fitoplanctónica, utilizando cuatro especies que conviven en el medio marino natural, y comparar su crecimiento *in vivo*, para que nos permita establecer las tendencias competitivas que existen entre las mismas.

Para el Grado en Ciencias Ambientales, sin embargo, el objetivo general es:

- Evaluar la toxicidad de los contaminantes antropogénicos que se encuentran en la actualidad en las zonas costeras y cómo estas concentraciones pueden llegar a cambiar la tendencia natural de la tasa de crecimiento que presentan las distintas poblaciones de una comunidad fitoplanctónica representativa del medio natural.

Conociendo estos objetivos generales, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Revisar bibliografía sobre la actualidad de los contaminantes en distintas partes del mundo, acotando los máximos y los mínimos encontrados en el agua de mar costera y siempre respetando las concentraciones medio ambientalmente significativas.
- Determinar si las tasas de crecimiento de estas especies elegidas pueden variar ante la presencia de los contaminantes seleccionados
- Analizar la competitividad que puede haber entre estas especies y cuáles son sus capacidades adaptativas de defensa.
- Determinar cuál es la especie más resistente y cuál la más sensible a estos contaminantes.

# MATERIALES Y MÉTODOS

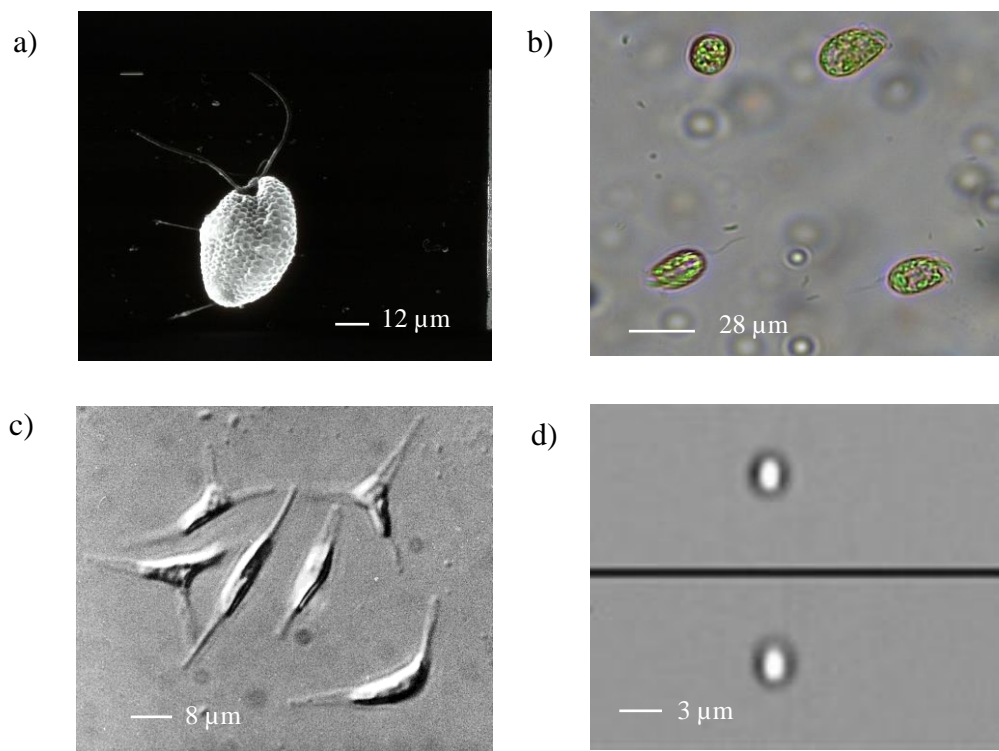
## 1. Material biológico

Para este estudio, se seleccionaron tres especies de microalgas: *Rhodomonas baltica* cepa RCC 350 (Phylum Cryptophyta), *Amphidinium carterae* cepa CCMM 09/0201 (Phylum Dinophyta) y *Phaeodactylum tricornutum* cepa CCMM 07/0402 (Phylum Bacillariophyta) y una especie de cianobacteria, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002 (Phylum Cyanophyta).

*R. baltica* (Karsten, 1898), pertenece a la Clase Criptophyceae (Orden Pyrenomonadales, Familia Pyrenomonadaceae) (Guiry & Guiry, 2021). Esta microalga marina, es eucariota, unicelular, fotoautótrofa y biflagelada. Su distribución se concentra sobre todo en el hemisferio norte, en concreto en lagos profundos y estratificados, debido a su amplio rango de tolerancia a las bajas temperaturas e intensidad de la luz (Tolotti, *et al.*, 2003). Se encuentra ampliamente distribuída en el Atlántico Norte, tanto en ambientes marinos, como en agua dulce (Gomes, *et al.*, 2020). Su tamaño oscila entre 10-14  $\mu\text{m}$  de longitud y 5-7  $\mu\text{m}$  de ancho y, morfológicamente, poseen un único cloroplasto de doble membrana y varios pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a* y *c2*, carotenos y xantofila, combinados con ficobilinas (ficoeritrina o ficocianina) (Palacios Bohórquez, 2016). La siguiente microalga marina utilizada ha sido *A. carterae* (Hulburt, 1957). Pertenece a la Clase Dinophyceae, (Orden Amphidinales, Familia Amphidiniaceae) (Guiry & Guiry, 2021). Es una microalga unicelular, eucariota, biflagelada y mixótrofa, que suele encontrarse en zonas tropicales y subtropicales y en aguas costeras templadas (Gárate, *et al.*, 2019). Tiene una forma ovalada y su tamaño oscila entre los 18-28  $\mu\text{m}$  de longitud y 13-18  $\mu\text{m}$  de ancho (Gárate, 2012), siendo la más grande de las especies seleccionadas en este trabajo. Al igual que muchas otras especies de dinoflagelados, es causante de floraciones nocivas (Harmful algal blooms ó HABs) debido a que es capaz de producir componentes bioactivos que, en un amplio rango, son perjudiciales y causan impactos toxicológicos costeros (Gárate, *et al.*, 2019). En cuanto a *P. tricornutum* (Bohlin, 1898), pertenece a la Clase Bacillariophyceae (Orden Bacillariophyta, Familia Phaeodactylaceae) (Guiry & Guiry, 2021), comúnmente conocidas como diatomeas. Es un alga unicelular, eucariota y autótrofa. Se puede encontrar en zonas de agua dulce, salobre y marina, en todo el mundo, y también en algunos hábitats terrestres húmedos (Borowitzka, 2018). Morfológicamente, su tamaño es de unos 8  $\mu\text{m}$  de longitud y 3  $\mu\text{m}$  de ancho (Lewin, 1958) y destaca porque puede adoptar tres formas diferentes: oval, fusiforme y trirradiada, siendo la forma oval, la que posee una frústula de sílice, y estando

el resto de morfologías rodeadas por una pared orgánica. También posee fucoxantina, un pigmento carotenoide, con capacidades antioxidantes (Borowitzka, 2018). La última especie utilizada ha sido *Synechococcus sp.* (Nägeli, 1849), Clase Cyanophyceae (Orden Synechrococcales, Familia Synechococcaceae) (Guiry & Guiry, 2021). Es una cianobacteria, y por tanto es un organismo unicelular procariota. Su tamaño es el más pequeño entre las especies seleccionadas, y es aproximadamente de 3  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.47  $\mu\text{m}$  de ancho (Rosales, *et al.*, 2008). Es un organismo fotoautótrofo, lo cual significa, que la luz solar es principal fuente de energía y el  $\text{CO}_2$  su única fuente de carbono. Por último, se caracteriza porque tolera altas intensidades de luz (Ludwig & Bryant, 2012) y, su tasa de crecimiento es extremadamente alta (Gordon, *et al.*, 2020).

En la Figura 1, se pueden observar fotografías de las distintas especies. En el *Anexo II*, se ha adjuntado una imagen en la que se pueden apreciar las diferencias entre las especies *A. carterae* y *Synechococcus sp.*, esta última, tanto cada célula por separado, como en pequeñas agregaciones.



**Figura 1.** Especies fitoplanctónicas seleccionadas para el estudio. a) *R. baltica*: se ve la citofaringe, los dos flagelos y el periplasto; b) *A. carterae* (microscopía óptica); c) *P. tricornutum* (microscopía de barrido (SEM)) Se observan las distintas formas descritas. Fuente: Bartual, *et al.*, 2008; d) *Synechococcus sp.* (microscopía óptica).

Los criterios de selección de las especies fitoplanctónicas para este estudio fueron fundamentalmente dos: su importancia ecológica en el medio marino costero y su tamaño celular.

Cianobacterias y microalgas, son organismos que se encuentran en la capa fótica de la columna de agua (zona más superficial) y tienen una gran importancia en el medio marino, ya que son los mayores productores de oxígeno, gracias a su capacidad autótrofa para la realización de la fotosíntesis. También, son los organismos que regulan los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes disponibles en el medio, siendo los que retiran un mayor porcentaje de carbono de la atmósfera por su contacto con la interfaz océano-atmósfera.

Desde un punto de vista ecológico, es importante que la elección se haya hecho entre distintas especies que forman parte del fitoplancton. Las especies seleccionadas engloban los diferentes rangos de tamaños del fitoplancton desde picoplancton (*Synechococcus sp.*), nanoplancton (*R. báltica* > *P. tricornutum*) y microplancton (*A. carterae*). Esto permite, que los resultados obtenidos puedan acercarse más a otros estudios ya realizados en el medio natural con este rango de tamaños. Además, el instrumento con el que se obtuvieron los datos es un citómetro de flujo, y este realiza un recuento del número de células que hay en cada muestra a analizar diferenciando por tamaños las células detectadas y, por tanto, es necesario que haya diferencias notables entre los tamaños de las especies elegidas.

## **2. Selección de los contaminantes y sus concentraciones**

En este estudio se han seleccionado un total de seis compuestos, cafeína, ciprofloxacina (antibiótico), cobre, cadmio, aldehídos poliinsaturados (PUAs) y nanopartículas de plata (NPsAg). De ellos, tres son considerados contaminantes emergentes (cafeína, ciprofloxacina, y nanopartículas de plata).

De los tres contaminantes emergentes utilizados, la cafeína, como sabemos, es un compuesto de uso diario, ya que se encuentra en bebidas y alimentos, como el café y el té, ciertos postres y en el chocolate. Es un buen indicador de la presencia de residuos humanos en el medio natural, y se ha encontrado en numerosos mares, ríos y estuarios, ya que son zonas susceptibles de recibir alta presión antropogénica. Las máximas concentraciones fueron reportadas por Wu, *et al.*, (2008), con 1350 ng/L en la bahía de Singapur en 2008, Comeau, *et al.*, (2008) con concentraciones de 1400 ng/L también en 2008 y Seabra, *et al.*, (2016) con 648.9 ng/L en la zona costera de Brasil en 2016 (entre otros estudios) (Paíga &

Delerue, 2017). Por ello, la concentración final de exposición a la cafeína utilizada es de 1  $\mu\text{g/L}$ . También se ha querido introducir entre estos contaminantes, un fármaco, en concreto la ciprofloxacina, que es un antibacteriano quinolónico que se clasifica como fluoroquinolona (Del Real Olvera, 2019) y que además se añadió en la última actualización de la “Lista de Vigilancia” referente a CECs en 2018 por la Comisión Europea. Este experimento se ha realizado con una concentración de exposición a la ciprofloxacina de 7  $\mu\text{g/L}$ , dado que se encuentra entre las concentraciones más altas registradas a las que este antibiótico tiene un efecto tóxico para organismos del fitoplancton (Blasco, *et al.*, 2017). Como último contaminante emergente, se han utilizado nanopartículas de plata (NPsAg), que en su mayoría se refieren a las especies  $\text{AgCl}_2^-$  (53.7%) y  $\text{AgCl}_3^{2-}$  (45.2%) en agua de mar, proceden de plásticos, cosméticos, textiles, pinturas, etc. todos ellos elementos de uso cotidiano. La concentración que se ha utilizado de NPsAg para el experimento es de 100  $\mu\text{g/L}$ , ya que, se ha visto que comienza a tener un efecto tóxico sobre algunas microalgas como *P. tricornutum* (Sendra, *et al.*, 2017b).

Los otros tres contaminantes escogidos han sido dos metales, cobre y cadmio, que se han encontrado en el medio natural con concentraciones de hasta 7  $\mu\text{g/L}$ , de cobre y de 0,6  $\mu\text{g/L}$  para el cadmio (Balls, 2003), siendo estos valores máximos los que se han tomado de referencia para el diseño experimental. Y, por último, hemos usado también aldehídos poliinsaturados ó PUAs. Estas moléculas no son realmente contaminantes, pues son de origen natural. Son metabolitos que algunos organismos fitoplanctónicos, como las diatomeas, liberan en medio marino como consecuencia de los daños celulares provocados por la depredación o la lisis celular (Miralto, *et al.*, 1999). La exposición de ciertas microalgas y consumidores a estos compuestos, hace que se reduzca su tasa de crecimiento incluso a bajas concentraciones (Pichierri, *et al.*, 2016) de modo que se han considerado tóxicos para distintos organismos. En este caso, los PUAs mezclados han sido: heptadienal (1mM), octadienal (0,77 mM) y decadienal (0,4 mM). La concentración que se ha utilizado en el ensayo de toxicidad ha sido de 1  $\mu\text{M}$ , puesto que es un rango observado en situación de floraciones o *blooms* de diatomeas en el medio marino (Vidoudez, *et al.*, 2011).

### 3. Diseño experimental

#### 3.1. Mantenimiento de los cultivos stocks

Las especies fitoplanctónicas descritas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL esterilizados en un autoclave (120 °C; 1,2 atm; 20') empleando agua de mar natural filtrada por 0.8 micras y enriquecida con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962), (composición detallada en el *Anexo III*). En el caso de *P. tricornutum* también se enriqueció con silicatos (Ojeda Rodríguez, 1976). Estos cultivos unialgales constituyeron los *stocks* que se emplearían en la experimentación, una vez alcanzaran su fase exponencial.

Los cultivos *stocks* unialgales, se mantuvieron en una cámara con unas condiciones estables de 20°C de temperatura y una luz continua cuya irradiancia era de 45  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Esta irradiancia (PAR o Radiación Fotosintéticamente Activa) fue medida con un radiómetro esférico *Biospherical Instruments Inc*. En caso de *R. baltica* se le atenuó la luz, dado que se observó que eran condiciones más adecuadas para su crecimiento, colocando una red semiopaca alrededor de su cultivo, como se observa en la Figura 2.

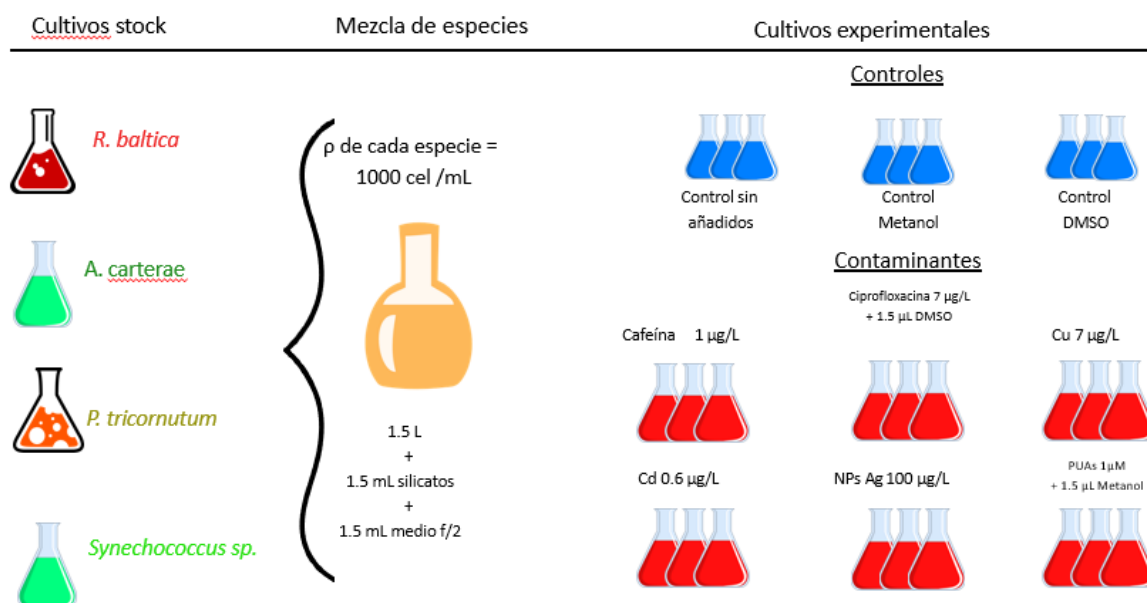


**Figura 2.** Fotografía que muestra los cultivos empleados dentro de la cabina de flujo laminar. También se distinguen los dos tubos estériles con contenido en f/2 y silicatos, necesario para llevar a cabo la siembra de los cultivos stock.

#### 3.2. Preparación de los cultivos experimentales

Para realizar el experimento, todo el material se limpió con una disolución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 10 % y después se enjuagaron con agua élux un total de 27 matraces Erlenmeyer de 100 mL, que eran los recipientes donde se prepararon los cultivos experimentales. Una vez hecho esto, el objetivo fue obtener una densidad celular de cada especie fitoplanctónica de  $10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ , y mezclarlas con estas densidades

aproximadamente dentro de 1.5 L de agua de mar filtrada por 0.2 micras y enriquecida con medio f/2 sin metales ni metales traza y silicatos. Esto se consiguió a partir de los cultivos *stock* unialgales. Una vez se obtuvo la mezcla de las especies con la densidad mencionada anteriormente de cada una (día 0 del experimento), se procedió a disponer los cultivos experimentales con 50 mL de la mezcla que contenía el agua de mar filtrada. Por último, hubo que preparar los contaminantes y añadirlos en un volumen adecuado para conseguir la concentración deseada. Para ello, se prepararon distintas disoluciones. En caso de las disoluciones de cafeína, cobre, cadmio y nanopartículas de plata, el disolvente utilizado fue el agua. Sin embargo, para la ciprofloxacina y los PUAs, los disolventes utilizados fueron el dimetil sulfóxido (DMSO) (Silviera, 1998) y el metanol, respectivamente. Esto es importante porque, se dispusieron, así, tres tipos de controles: uno sin ningún añadido, otro con un volumen de DMSO (como control de la ciprofloxacina) y otro con un volumen de metanol (como control de los PUAs). De este modo, también se pudo hacer la comprobación con el control sin añadidos, de si el efecto que tenían la ciprofloxacina y los PUAs sobre las especies fitoplanctónicas era únicamente debido al contaminante o también actuó negativa o positivamente el disolvente. En la Figura 3, se puede observar un esquema del desarrollo del diseño experimental.



**Figura 3.** Diseño experimental para la realización del ensayo de toxicidad de 72 h.



### 3.3. Ensayo de toxicidad

El ensayo de toxicidad (que se realizó por duplicado), consistió en la exposición de los cultivos experimentales con mezcla de especies a los contaminantes descritos durante 72 h y se realizó durante este tiempo, un seguimiento de las densidades celulares. De este modo, se puede medir la inhibición del crecimiento de cada especie expuesta a cada contaminante, al compararla con un cultivo control al que no se le añade contaminante alguno. Se calcularon así las tasas de crecimiento, partiendo de una densidad poblacional de cada una de las especies de  $10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$  (aproximadamente) en el día 0 del experimento (Sendra, *et al.*, 2017b). En este tiempo, para obtener los datos de la densidad celular de cada especie de fitoplancton, se usó la técnica de citometría de flujo.

El citómetro de flujo utilizado, es el modelo BD Accuri C6, que se muestra en la Figura 4.

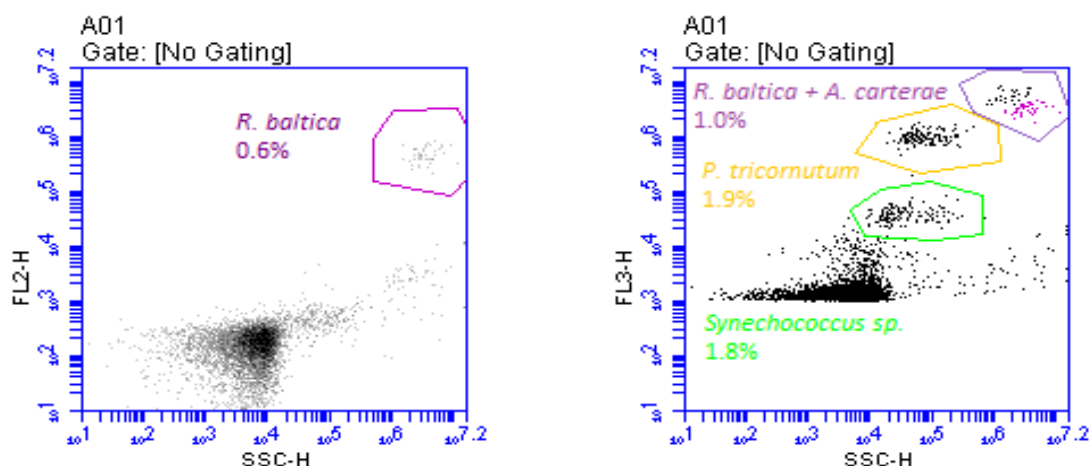


**Figura 4.** Citómetro de flujo, modelo BD Accuri C6 con el que se realizaron los recuentos celulares del ensayo de toxicidad.

Este instrumento detecta y cuenta las células (partículas) de las muestras de cultivo experimental cuando estas pasan a través del haz de luz de un láser. El recuento celular se realizó a las 24, 48 y 72 horas, tras la adición de los contaminantes. El parámetro SSC (*Side light Scatter*) se relaciona con la complejidad morfológica celular, midiendo la dispersión lateral de la luz al contacto con una partícula. Esto se relaciona con la fluorescencia de los pigmentos que cada una de las especies contiene y que aparecen en el eje y, correspondiendo FL2 a la ficobilina, para una longitud de onda de 585/40 nm y FL3 a la clorofila *a* para una longitud de onda de 670 LP nm (Sendra, *et al.*, 2017b), de los citogramas obtenidos en la Figura 5. En este caso concreto, se observa cómo cada una de las especies se diferencia según

su tamaño, y según el pigmento que contienen y la intensidad del mismo que el citómetro de flujo ha detectado.

Para realizar las medidas de las densidades poblacionales de *R. baltica*, *A. carterae*, *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.*, se tomó 1 mL de muestra de cada matraz a las horas establecidas para la realización de las mediciones.



**Figura 5.** Citogramas tipo obtenido con el citómetro de flujo. La imagen de la izquierda representa el parámetro SSC-H y FL2-H (ficobilina) y la especie *Rhodomonas baltica*. Y, en la imagen de la derecha, los parámetros que aparecen son SSC-H y FL3-H (clorofila a) y las especies *Amphidinium carterae*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Synechococcus sp.*

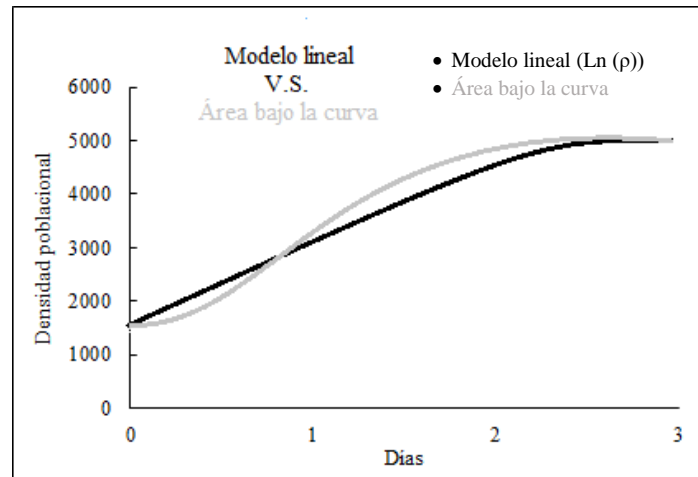
El ensayo de toxicidad se repitió una segunda vez y de este modo se pudieron corroborar los resultados obtenidos en el primer ensayo que se realizó.

## 4. Cálculos realizados

### 4.1. Tasas de crecimiento

Como se observa en la Figura 6, hay dos formas de calcular las tasas de crecimiento. La primera se basa en obtener la tasa de crecimiento a partir de la ecuación de la recta obtenida de la parte lineal de la función del logaritmo neperiano del crecimiento ( $\ln(\rho \text{ poblacional})$ ). El otro método, consiste en calcular el área bajo la curva de la función exponencial del crecimiento (Thome Coppo, 2009). Matemáticamente, es más acertado calcular las tasas de crecimiento utilizando los patrones de crecimiento que muestra la curva exponencial porque calcula el área real que muestra la curva de crecimiento, en vez de, la expresión lineal. Sin embargo, en este trabajo, se decidió utilizar ambas, debido a que la tasa de crecimiento

obtenida a partir de la ecuación de la recta de la parte linealizada de la función del crecimiento, tiene unas unidades ( $\text{día}^{-1}$ ) más comparables con otras tasas de crecimiento ya obtenidas en otros ensayos con especies fitoplanctónicas y publicadas en distinta bibliografía. Sin embargo, el área bajo la curva de la función exponencial, permite un cálculo de los porcentajes de inhibición de un modo más preciso (Nyholm, 1990).



**Figura 6.** Área bajo la curva. Representación gráfica de las dos formas de calcular la tasa de crecimiento. Fuente: elaboración propia.

Este segundo método, el área bajo la curva, se ha calculado de la siguiente forma:

$$\text{área bajo la curva} = \frac{(\rho \text{ día 1} - \rho \text{ día 0})}{2} + (\rho \text{ día 1} - \rho \text{ día 0}) + \frac{(\rho \text{ día 2} - \rho \text{ día 1})}{2} + (\rho \text{ día 1} - \rho \text{ día 0}) + (\rho \text{ día 2} - \rho \text{ día 1}) + \frac{(\rho \text{ día 3} - \rho \text{ día 2})}{2}$$

## 4.2. Porcentaje de inhibición

A partir del cálculo del área total de la función de la gráfica se calculó el porcentaje de crecimiento, teniendo en cuenta las tres réplicas y la media de su control correspondiente. Por último, se obtuvo el porcentaje de inhibición como:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \% - \% \text{ crecimiento}$$

Los datos del porcentaje de inhibición, se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para  $N = 3$ .

## 4.3. Tratamiento de datos y estadística

La recopilación de datos, y la realización de tablas y gráficas se han llevado a cabo con el programa Microsoft Excel, versión 2013, realizando los cálculos necesarios y explicados en los apartados anteriores. Sin embargo, para realizar un tratamiento de estos datos, desde

un punto de vista estadístico, se ha utilizado el programa GraphPad Prism, versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos y el programa Statistica versión 10.0. Así, se han realizado dos tipos de test estadísticos. En primer lugar, un t-test para variables independientes, que es un test no paramétrico que compara la misma variable para dos grupos diferentes. También se ha realizado un test ANOVA de una vía y test post-hoc de Tukey, para constatar las posibles diferencias significativas entre los efectos de cada uno de los contaminantes para las cuatro especies. Ambos tests indican si la diferencia entre las medias  $\pm$  desviación estándar (tres réplicas,  $n = 3$ ) es estadísticamente significativa o no asumiendo que si el p-valor es menor de 0.05, entonces el resultado es estadísticamente significativo. Si por el contrario, el p-valor es mayor de 0.05, entonces las diferencias no serán estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### I. Tasas de crecimiento

En primer lugar, se han analizado los resultados de las tasas de crecimiento obtenidas a partir del ajuste lineal del Ln de cada especie.

Para conocer lo que ocurriría en una situación normal de convivencia de estas cuatro especies fitoplanctónicas, se tomaron como referencia los valores de crecimiento de los controles sin presencia de contaminantes. De esta forma, se puede observar que en la Figura 7, las tasas de crecimiento más altas las obtuvieron *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.* con unos valores de  $1.204 \pm 0.020$  día<sup>-1</sup> y  $1.176 \pm 0.016$  día<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que *R. baltica* y *A. carterae* tuvieron unas tasas de crecimiento aproximadamente un 50% más bajas, correspondiéndole valores de  $0.594 \pm 0.050$  día<sup>-1</sup> y  $0.429 \pm 0.067$  día<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 1 y Tabla 2).

Una vez que ya se comprobó cómo actuaban las densidades poblacionales de estas especies en situaciones control, se constató que, con la presencia de contaminantes, las tasas de crecimiento se vieron afectadas de distintos modos. *Synechococcus. sp.* fue la especie cuya tasa de crecimiento se vio más afectada por la presencia de contaminantes, ya que, a excepción del Cadmio, todos ejercieron un efecto negativo en el crecimiento de su población de una manera significativa (p-valor < 0.05). Los valores más significativos (p-valor = 0.0001), se obtuvieron debido a la presencia de ciprofloxacina en el medio, que disminuyó

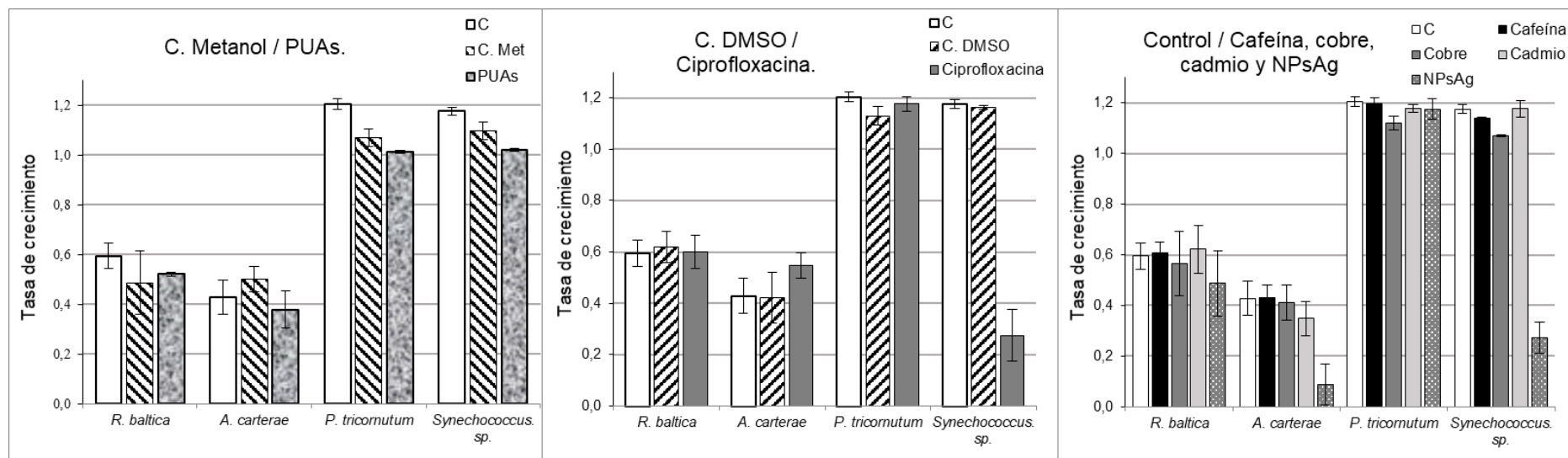
la tasa de crecimiento de las cianobacterias desde  $1.164 \pm 0.007 \text{ día}^{-1}$  (condiciones control) hasta  $0.275 \pm 0.101 \text{ día}^{-1}$ . Las NPsAg también provocaron una fuerte caída de las tasas de crecimiento para esta especie (de  $1.176 \pm 0.016 \text{ día}^{-1}$ , hasta una media de  $0.273 \pm 0.063 \text{ día}^{-1}$ ).

En el caso de *A. carterae*, fueron únicamente las NPsAg las que ejercieron un efecto negativo significativo (p-valor = 0.005) en la tasa de crecimiento, disminuyéndola desde  $0.429 \pm 0.067 \text{ día}^{-1}$ , hasta  $0.087 \pm 0.080 \text{ día}^{-1}$ . Sin embargo, en presencia de ciprofloxacina, este dinoflagelado, mostró un incremento en su tasa de crecimiento de un  $0.045 \text{ día}^{-1}$  (desde  $0.422 \pm 0.099 \text{ día}^{-1}$ , hasta  $0.546 \pm 0.049 \text{ día}^{-1}$ ). Con respecto a *P. tricornutum*, solo se vio afectada por la presencia de cobre que redujo su tasa de crecimiento de  $1.204 \pm 0.020 \text{ día}^{-1}$  a  $1.119 \pm 0.026 \text{ día}^{-1}$ , así como por la presencia de PUAs que redujeron su tasa de crecimiento desde  $1.070 \pm 0.035 \text{ día}^{-1}$  hasta  $1.013 \pm 0.006 \text{ día}^{-1}$ . Aun así, las tasas de crecimiento obtenidas por esta diatomea son las más altas en comparación con las otras tres especies, aunque sufra alguna reducción significativa de su crecimiento.

Por último, *R. baltica*, no presentó ninguna alteración de su tasa de crecimiento estadísticamente significativa, en presencia de estos seis contaminantes (p-valor > 0.05).

Es importante puntualizar, que las recomendaciones para este tipo de diseño experimental indican que cuando un contaminante no se prepara con agua como disolvente, sino que se prepara a partir de un disolvente orgánico, emulsionante o dispersante, no se deben exceder los 100 mg/L de disolvente (OECD, 1984). La concentración de metanol añadida en los controles que sirven para los PUAs, fue de 1 µg/L, muy por debajo de las recomendaciones consultadas.

Aun así, se ha comprobado que hubo diferencias significativas entre las tasas de crecimiento del control sin añadidos y el control de metanol, por lo que se puede afirmar que hay un efecto de toxicidad sinérgica entre el metanol y los PUAs. Esto quiere decir que la disminución de la tasa de crecimiento las poblaciones fitoplanctónicas debido a los PUAs, podría verse incrementada porque el metanol también tiene un efecto negativo. Este efecto sinérgico ocurre para dos de las cuatro especies, *P. tricornutum* y *Synechococcus. sp.* Lo mismo ocurre entre el control sin añadidos y el control DMSO para la ciprofloxacina. Sin embargo, en este caso, solo afecta a *P. tricornutum*, lo cual significa que el DMSO y la ciprofloxacina, en las concentraciones en las que se han añadido tienen un efecto negativo sinérgico para el crecimiento de *P. tricornutum*, comparado con el control.



**Figura 7.** Tasas de crecimiento de cada especie en el cultivo mixto (promedio  $\pm$  desviación estándar ( $\text{día}^{-1}$ );  $n = 3$ ) expuestas a cada contaminante, comparadas con sus respectivos controles.

**Tabla 1.** Tasas de crecimiento de cada una de las especies fitoplanctónicas empleadas para cada control, expresadas como la media  $\pm$  desviación estándar ( $\text{día}^{-1}$ ). Diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0.05$ . (Test ANOVA de una vía y pos-hoc de Tukey).

	Control	Control Metanol	Control DMSO
<i>R. baltica</i>	0,594 $\pm$ 0,050 <sup>a</sup>	0,487 $\pm$ 0,128 <sup>a</sup>	0,619 $\pm$ 0,062 <sup>a</sup>
<i>A. carterae</i>	0,429 $\pm$ 0,067 <sup>b</sup>	0,501 $\pm$ 0,052 <sup>a</sup>	0,422 $\pm$ 0,099 <sup>b</sup>
<i>P. tricornutum</i>	1,204 $\pm$ 0,020 <sup>c</sup>	1,070 $\pm$ 0,035 <sup>b</sup>	1,130 $\pm$ 0,035 <sup>c</sup>
<i>Synechococcus sp.</i>	1,176 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>	1,097 $\pm$ 0,035 <sup>b</sup>	1,164 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>

**Tabla 2.** Tasas de crecimiento de cada una de las especies fitoplanctónicas tras la exposición a cada contaminante expresadas como la media  $\pm$  desviación estándar ( $\text{día}^{-1}$ ). Diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0.05$ . (Test ANOVA de una vía y pos-hoc de Tukey).

	Cafeína	Ciprofloxacina	Cobre	Cadmio	PUAs	NPsAg
<i>R. baltica</i>	0,610 $\pm$ 0,043 <sup>a</sup>	0,602 $\pm$ 0,064 <sup>a</sup>	0,566 $\pm$ 0,127 <sup>a</sup>	0,622 $\pm$ 0,095 <sup>a</sup>	0,522 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,487 $\pm$ 0,128 <sup>a</sup>
<i>A. carterae</i>	0,429 $\pm$ 0,050 <sup>b</sup>	0,546 $\pm$ 0,049 <sup>a</sup>	0,410 $\pm$ 0,069 <sup>a</sup>	0,349 $\pm$ 0,067 <sup>b</sup>	0,378 $\pm$ 0,074 <sup>b</sup>	0,087 $\pm$ 0,080 <sup>b</sup>
<i>P. tricornutum</i>	1,196 $\pm$ 0,026 <sup>c</sup>	1,176 $\pm$ 0,030 <sup>b</sup>	1,119 $\pm$ 0,026 <sup>b</sup>	1,178 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>	1,013 $\pm$ 0,006 <sup>c</sup>	1,175 $\pm$ 0,040 <sup>c</sup>
<i>Synechococcus sp.</i>	1,139 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,275 $\pm$ 0,101 <sup>b</sup>	1,070 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>	1,177 $\pm$ 0,034 <sup>c</sup>	1,019 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,273 $\pm$ 0,063 <sup>a, b</sup>

En las Tablas 1 y 2, se expresan numéricamente las tasas de crecimiento. El test estadístico realizado indica si las diferencias que hay entre el efecto de cada contaminante, para las distintas tasas de crecimiento de cada especie fitoplanctónica, son significativas o no.

En la Tabla 1 se muestran las tasas de crecimiento para los tres controles. Las interacciones que ha habido entre las cuatro especies en el control sin ningún contaminante, han coincidido con los efectos observados en el control con contenido en DMSO. En estos casos, se han encontrado diferencias significativas entre *R. baltica* y *A. carterae* con *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.*, aunque estas dos últimas no mostraron diferencias significativas entre sí (*R. baltica* = a; *A. carterae* = b; *P. tricornutum* = c; *Synechococcus sp.* = c). Estos mismos efectos, se observan en la Tabla 2, cuando estas especies se encontraron en presencia de cafeína, cadmio y PUAs.

Por otro lado, el control con metanol añadido, diferencia los efectos significativos dos a dos, es decir, *R. baltica* y *A. carterae* presentan los mismos efectos, y *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.* también, aunque entre cada uno de los pares de especies, haya habido significancia en los resultados obtenidos.

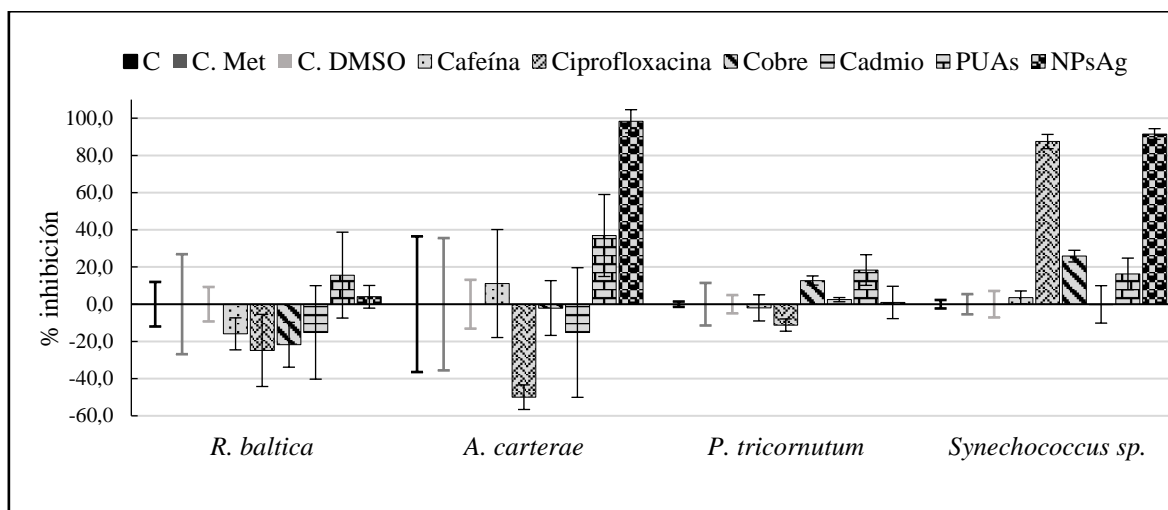
Un último caso fue el efecto que produjeron los PUAs a estas especies que se encontraban mezcladas. Todas las especies presentaron efectos distintos entre sí, excepto *Synechococcus sp.* que no presentó diferencias ni con *R. baltica* ni con *A. carterae*.

## **II. Porcentajes de inhibición**

También se realizó un análisis comparativo de los porcentajes de inhibición de los contaminantes que se han representado en la Figura 8, para cada una de las especies fitoplanctónicas. Los porcentajes de inhibición que se encuentran por encima del 0, son aquellos que inhiben el crecimiento, mientras los que se encuentran en la parte negativa del eje y, son los que muestran que no hay inhibición del crecimiento o que incluso el crecimiento de una población se ve favorecido por la presencia de ciertos contaminantes. También es importante saber que los controles, tanto el control sin añadido ninguno, como los controles de metanol y DMSO, por definición, presentan un porcentaje de inhibición de un 0 %. Esto ocurre porque son calculados a partir de la media de las tres réplicas realizadas



para cada uno de ellos y es por ello por lo que en la gráfica únicamente se ven las barras de error de la desviación estándar de los controles.



**Figura 8.** Porcentajes de inhibición obtenidos de cada contaminante para las cuatro especies fitoplanctónicas.

En la gráfica se puede observar que la cianobacteria es la especie más afectada por los contaminantes utilizados. Las mayores inhibiciones se obtuvieron en presencia de la ciprofloxacina, que alcanzó el  $87.4 \pm 3.8$  % y las NPsAg donde la inhibición fue casi del 100 % ( $91.5 \pm 2.9$  %). Les siguen el cobre con un  $25.8 \pm 3.2$  % y los PUAs con un  $16.3 \pm 8.5$  %.

En el caso de *P. tricornutum* y *A. carterae*, solo dos de los contaminantes para cada una, variaron el porcentaje de inhibición de forma significativa en comparación con el control correspondiente. Para *P. tricornutum*, el contaminante que más inhibió su crecimiento fue el cobre, que provocó un  $12.7 \pm 2.5$  % de inhibición. Sin embargo, la ciprofloxacina favoreció su crecimiento en un  $11.2 \pm 3.3$  %. Para *A. carterae*, la ciprofloxacina actuó de la misma manera que para la diatomea. En este caso el porcentaje obtenido que favoreció el crecimiento de *A. carterae* fue de un 50 %. Las NPsAg, sin embargo, ejercieron un efecto negativo para este dinoflagelado, con un porcentaje de inhibición del 98.4 %, que es el más alto alcanzado de todos, para las especies fitoplanctónicas ensayadas.

Al contrario que para el resto de especies, *R. baltica*, no experimentó una inhibición del crecimiento que sea significativa en comparación con los controles.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de cada especie para cada contaminante. Los datos vienen expresados en media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas para  $p < 0.05$ . (Test ANOVA de una vía y pos-hoc test de Tukey). Si no hay diferencias significativas entre ninguna de las cuatro especies, no se escribe ningún superíndice.

	<b>Cafeína</b>	<b>Ciprofloxacina</b>	<b>Cobre</b>	<b>Cadmio</b>	<b>PUAs</b>	<b>NP Ag</b>
<b><i>R. baltica</i></b>	-15.95 $\pm$ 8.60	-24.86 $\pm$ 19.38 <sup>a</sup>	-21.80 $\pm$ 12.04 <sup>a</sup>	-15.16 $\pm$ 25.13	15.66 $\pm$ 23.09	3.99 $\pm$ 6.09 <sup>a</sup>
<b><i>A. carterae</i></b>	11.11 $\pm$ 29.03	-50.00 $\pm$ 6.60 <sup>a, b</sup>	-2.06 $\pm$ 14.73 <sup>a, b</sup>	-15.23 $\pm$ 34.84	36.93 $\pm$ 22.03	98.35 $\pm$ 6.21 <sup>b</sup>
<b><i>P. tricornutum</i></b>	-1.99 $\pm$ 7.03	-11.23 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	12.73 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	2.45 $\pm$ 1.13	18.37 $\pm$ 8.24	0.95 $\pm$ 8.69 <sup>a</sup>
<b><i>Synechococcus sp.</i></b>	3.62 $\pm$ 3.48	87.45 $\pm$ 3.84 <sup>c</sup>	25.84 $\pm$ 3.15 <sup>b</sup>	-0,10 $\pm$ 10.05	16.28 $\pm$ 8.52	91.48 $\pm$ 2.88 <sup>b</sup>

Por último, en la Tabla 3 se muestran los efectos de cada contaminante para los porcentajes de inhibición de cada una de las especies. Para completar los superíndices se ha realizado el mismo test estadístico que para las Tablas 1 y 2. Por lo tanto, se puede decir, que, para el caso de cafeína, cadmio y PUAs los efectos fueron los mismos para las cuatro especies y no hubo diferencias significativas entre las distintas especies, mientras que, para la ciprofloxacina hay diferencias significativas entre *A. carterae* y *Synechococcus sp.*, aunque el efecto de este antibiótico para *R. baltica*, *A. carterae* y *P. tricornutum* son similares. Los efectos del cobre, sí mostraron diferencias significativas entre *R. baltica* y *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.* Sin embargo, para las NPsAg, los efectos fueron similares para *A. carterae* y *Synechococcus sp.*, mientras que no coincidieron con los efectos que este contaminante tuvo para *R. baltica* y *P. tricornutum*.

## DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos, *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.* serían especies dominantes en las condiciones control, pues sus tasas de crecimiento son mayores a las de *R. baltica* y *A. carterae* (Tablas 1 y 2). Esta mayor tasa de crecimiento es consistente al tamaño celular que cada una de estas cuatro especies fitoplanctónicas presenta. A nivel ecológico, la mayor tasa de crecimiento puede suponer una ventaja competitiva frente a las células más grandes en condiciones naturales. Además, las células más grandes tienen una relación superficie/volumen menor que las células de menor tamaño, haciendo que sean menos eficientes en la captación de nutrientes, mientras que las especies más pequeñas pueden ser más competitivas en una situación en la que los nutrientes sean un factor limitante (Tambi, *et al.*, 2009; Baho, *et al.*, 2019). Cualquier cambio en la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua, afectará a la mayor o menor abundancia de ellas. Así, por ejemplo, en verano, cuando la columna de agua se estratifica como consecuencia del aumento de la temperatura de la capa superficial, la disponibilidad de nutrientes en la capa fótica disminuye, mientras que, en invierno, se estima una mayor disponibilidad de nutrientes al mezclarse aguas profundas ricas en nutrientes que homogenizan la columna de agua, aunque por las bajas temperaturas, la biomasa de fitoplancton es menor (Casas, *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos nos muestran que la presencia de algunos contaminantes en el medio alteró esta tendencia natural al dominio de estas dos especies. Así, se observó que

*R. baltica* fue la especie más resistente a los seis contaminantes ensayados ya que no mostró diferencias significativas con los controles en condiciones naturales, frente a la mayor susceptibilidad de *Synechococcus sp.* (Figura 7) ante la ciprofloxacina o las nanopartículas, por ejemplo. Hay trabajos que coinciden en que las especies más pequeñas son más vulnerables a la presencia de contaminantes (Echeveste, *et al.*, 2012; Baho, *et al.*, 2019), ya que su alta relación superficie/volumen se relaciona con un aumento de la capacidad de incorporar contaminantes (Echeveste, *et al.*, 2012), es decir, lo que en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes les reporta una ventaja, se transforma en desventaja ante la presencia de algún contaminante. No obstante, la permeabilidad de la membrana a cada compuesto varía de unas especies a otras y el modo de actuación de los contaminantes. *P. tricornutum* también mostró bastante resistencia a los contaminantes testados, pero hubo dos de ellos que disminuyeron su tasa de crecimiento en comparación con su crecimiento en condiciones sin contaminación, que fueron el cobre y los PUAs. Sin embargo, es posible, como se explicó en la sección de resultados, que para los PUAs haya podido haber un efecto sinérgico de la acción del metanol. Aun así, la tasa de crecimiento de *P. tricornutum*, en presencia de estos dos contaminantes, supera la tasa de crecimiento de *R. baltica*, siendo aquella del doble respecto a esta. La mayor resistencia mostrada por *R. baltica*, es consistente con su distribución en el medio marino, ya que esta criptofita se encuentra ampliamente distribuida en aguas dulces y estuáricas (Dionis, 2017), al igual que *P. tricornutum*, que se encuentra en ambientes costeros, y es capaz de adaptarse a condiciones inestables como pueden ser los estuarios o las charcas rocosas (De Martino, *et al.*, 2007). En el Golfo de Cádiz, *R. baltica* es especialmente abundante en las desembocaduras del Guadalete y Guadalquivir, donde es habitual encontrar altas concentraciones de fármacos y compuestos liberados en los efluentes de los ríos (Biel, *et al.*, 2018). Sin embargo, *Synechococcus* es menos abundante en zonas costeras, siendo un género dominante en el océano oligotrófico (Liu, *et al.*, 2015). Así *R. baltica* y *P. tricornutum*, al desarrollarse en ambientes naturales marinos más cercanos a las costas donde las aguas son más vulnerables a sufrir una presión antropogénica de contaminación, debido al aporte que llega de las desembocaduras de los ríos o las aguas de escorrentía procedente de las precipitaciones (Arias, *et al.*, 2017), sufren una exposición más continuada en el tiempo a mayores concentraciones de contaminantes, pudiendo desarrollar cierta tolerancia (Pollution-Induced Community Tolerance o PICT) a los mismos. Sin embargo, el género *Synechococcus*, al ser más característico de las zonas oceánicas oligotróficas, podría ser más vulnerable a altas concentraciones de ciertos contaminantes, tales como los utilizados en estos ensayos de toxicidad.

Con respecto a los contaminantes testados, la cafeína es un contaminante que se ha llegado a encontrar en aguas superficiales en concentraciones muy altas. Por ejemplo, en algunas zonas de Latinoamérica, se han llegado a encontrar máximos de 3.8 µg/L en agua potable, en la bahía jamaicana de hasta 5 µg/L (Peña Guzmán, *et al.*, 2019) y en el golfo de Cádiz de hasta 327 ng/L en aguas costeras, mientras que en aguas oceánicas el máximo fue de 96.6 ng/L (Biel, *et al.*, 2018). Dado que la población marina de organismos fitoplanctónicos en este estudio es mixta y son especies que pueden convivir en zonas costeras, las concentraciones a las que se expondrán deberían ser mayores. Los resultados mostraron que solo *Synechococcus sp.* fue sensible a la presencia de cafeína, con una leve reducción de su tasa de crecimiento (Figura 7) e inhibición (Tabla 3). Esta tendencia es contraria a lo encontrado en la bibliografía, así, Lawrence, *et al.*, (2011), mostraron que la densidad poblacional de cianobacterias, en presencia de cafeína, no fue reducida cuando se expuso a una concentración de 5 µg/L, mientras que sí se redujeron las comunidades de bacterias heterótrofas. En el estudio de Lopes de Sousa, *et al.*, (2021), también se constata que las cianobacterias, entre otros organismos (también de otros niveles tróficos), no se vieron afectadas a una concentración de cafeína de 300 µg/L. Por último, Lawrence, *et al.*, (2011) y Richmond, *et al.*, (2017), sugieren que la reducción de cianobacterias puede estar relacionada en el medio natural con el aumento de la tasa metabólica de organismos que se encuentran por encima del fitoplancton en la cadena trófica, ya que se alimentan de estos grupos fitoplanctónicos, y hacen que se disminuya su densidad poblacional (Lawrence, *et al.*, 2011; Richmond, *et al.*, 2017). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo, no se han podido corroborar porque en este estudio únicamente se han empleado cuatro especies distintas pertenecientes a la comunidad fitoplanctónica, y no otros grupos de la comunidad planctónica.

De todos los contaminantes, la ciprofloxacina fue uno de los que afectó a *Synechococcus sp.* de manera más significativa (Figura 7 y Figura 8). Este resultado es coherente teniendo en cuenta que la ciprofloxacina es un antibiótico para las bacterias heterótrofas gram-negativas (Marasini, *et al.*, 2016). Como se ha mencionado anteriormente, esta es la única especie de las empleadas que pertenece al Phylum cianobacteria. Curiosamente, la ciprofloxacina favoreció el crecimiento del dinoflagelado *A. carterae* (Figura 8). Esto puede deberse a que es complicado obtener un cultivo axénico de esta especie dinoflagelada, como ya han investigado otros autores (Nayak, *et al.*, 1997; Liu, *et al.*, 2017). Los cultivos de esta especie en concreto, suelen tener algunas bacterias asociadas,

que son generalmente gram negativas (Simidu, *et al.*, 1971). En estos otros estudios, se intentó obtener cultivos axénicos añadiendo distintos tipos de antibióticos, entre ellos, ciprofloxacina (Mass, *et al.*, 2007) y el resultado fue que no se consiguió eliminar el 100% de las bacterias asociadas a *A. carterae* ya que, al cabo de algunos meses, volvían a aparecer (Liu, *et al.*, 2017). Pero, aun en presencia de ciertos antibióticos, *A. carterae* fue capaz de seguir creciendo. Dado que los cultivos experimentales del presente trabajo eran mixtos, (unialgales, pero no axénicos), es posible que el crecimiento de *A. carterae* se pudiera ver favorecido en presencia de un antibiótico, aparte de que *Synechococcus sp.*, se ve drásticamente reducida y no mostrará por lo tanto ninguna capacidad competitiva en presencia de este contaminante. Así, en un posible escenario natural de contaminación por ciprofloxacina, los resultados de las dinámicas poblacionales se podrían ver muy afectados: *Synechococcus sp.*, que en condiciones control parece ser una de las especies dominantes, en presencia de ciprofloxacina se ve altamente reducida. Esto puede provocar que *P. tricornutum*, cuando no hay presencia de contaminantes en el medio natural, siga siendo dominante, ya que la presencia de este antibiótico no le ha afectado. Aun viéndose *A. carterae* altamente favorecida en presencia de ciprofloxacina, la tasa de crecimiento de *P. tricornutum* es el doble que la de *A. carterae*. En este caso, puede ser que, aunque la diatomea siga creciendo a más velocidad que el dinoflagelado, se dé un *bloom* de *A. carterae* ya que no es una situación normal que esta especie pueda crecer tanto, mientras que *P. tricornutum* mantiene su línea de crecimiento, pero sin aumentar su tasa. Sin embargo, ante esta situación de dominancia de *A. carterae*, puede ser que haya afectado a *R. baltica* y *P. tricornutum* por las toxinas que *A. carterae* es capaz de producir en presencia de ciprofloxacina. Según Mass, *et al.*, (2007), la producción total de toxinas de *A. carterae* en presencia de este antibiótico, puede llegar a ser de un  $20.6 \pm 1.66$  %, respecto a la producción en condiciones sin contaminación. Así, se postula que, según los resultados de este estudio, la producción de estos compuestos tóxicos podría inhibir el crecimiento de *R. baltica* y *P. tricornutum*, siendo así entonces *A. carterae*, la que presenta una mayor capacidad de competencia interespecífica en presencia de ciprofloxacina. No obstante, esta teoría debería ser comprobada con un diseño experimental enfocado a cuantificar la liberación de toxinas de *A. carterae* en presencia y ausencia de las otras especies. La situación de dominancia de *A. carterae* en el medio natural ante un problema de contaminación por un antibiótico podría, pues, desencadenar lo que se conoce como mareas rojas, o HABs. A lo largo de los últimos años, ha aumentado la frecuencia de los HABs en las zonas costeras, siendo estos cada vez más intensos (Nelson, *et al.*, 2015; Philips, *et al.*, 2015; Zhou, 2020). Si, además, se tiene en

cuenta que la llegada de fármacos a la costa tiene dos picos, uno durante el verano, debido posiblemente a la llegada de turistas a las casas vacacionales, y otro al final del invierno, cuando se da un aumento de resfriados por las bajas temperaturas (Feo, *et al.*, 2020), se puede considerar que la presencia de ciprofloxacina puede inducir la aparición de *blooms* en zonas costeras. Entre 60 y 80 especies de fitoplancton se han notificado como especies dañinas, siendo el 90 % flageladas y en su mayoría dinoflagelados, como *A. carterae* (Smayda, 1997). Estos HABs de dinoflagelados (Rodríguez González, *et al.*, 2010), tienen diversos impactos, e incluso acaban afectando a los seres humanos porque somos consumidores de estas microalgas marinas de un modo indirecto, a través de otros seres vivos como peces, crustáceos o moluscos, es decir, que podrían llegar a nosotros a través de las redes tróficas, donde ocupamos un nivel elevado. En todo caso, la mayor causa por la que estas afloraciones se producen parece ser, la descarga de residuos ricos en nutrientes que permiten el mantenimiento de una alta densidad de población de este tipo de algas (Anderson, *et al.*, 2021).

De todos los contaminantes utilizados, los que han producido un efecto más nocivo en los porcentajes de inhibición de *A. carterae* y de *Synechococcus sp.* (Figura 8 y Tabla 3) son las nanopartículas de plata, que como se mencionó anteriormente proceden de productos de uso cotidiano como el plástico, los cosméticos o textiles, entre otros, mientras que estas NPsAg no han tenido efectos negativos en el crecimiento de *P. tricornutum* ni de *R. baltica*. Los efectos tóxicos que pueden tener las NPsAg sobre algunas especies fitoplanctónicas, se relacionan con su capacidad de unión a la superficie de las células, y pueden afectar a las tasas de crecimiento de la especie, a su interacción con otros compuestos en el medio y a la producción de clorofila *a* (Sendra, *et al.*, 2017b). También tienen efectos antibacterianos (Chávez Andrade, *et al.*, 2019). Este efecto se debe a la liberación de iones  $\text{Ag}^+$ , que aumentan la permeabilidad de las membranas celulares de bacterias gram-negativas a las que son capaces de unirse dadas estas cargas contrarias y cuyo efecto es irreversible (Chávez Andrade, *et al.*, 2019). Si estas NPsAg llegan a modificar la permeabilidad de la membrana celular a la que se unen, pueden llegar a atravesar los poros de dichas membranas. Esto dependerá del diámetro de los poros y de los tamaños de las NPsAg, siendo únicamente las NPsAg que tengan tamaño inferior a los poros las que puedan atravesar la membrana celular (Navarro, *et al.*, 2008). Una vez consiguen atravesarla, inducen a formar nuevos poros que sean incluso de mayor tamaño que los que ya había. Este hecho provoca una mayor entrada de nanopartículas de plata al interior de la célula (Navarro, *et al.*, 2008). En este caso,

*Synechococcus sp.* es una cianobacteria con una membrana gran-negativa (Santos Merino, 2017), de tal forma que las NPsAg podrían tener más facilidad de unión a su membrana y haber incrementado su permeabilidad. Esto es coherente con los resultados obtenidos. Es posible que la permeabilidad de la membrana de *A. carterae* en presencia de estas NPsAg también se vea modificada y sea por esto por lo que también resultó tener el porcentaje de inhibición más alto, casi del 100%. También hay estudios que demuestran la inactividad de *A. carterae* en presencia de nanocompuestos de TiO<sub>2</sub> de plata. El efecto que tienen los compuestos de plata en especies como *A. carterae* es que inhiben el transporte de electrones porque la plata los captura, de forma que suprimen el funcionamiento de la membrana celular, y por lo tanto de la célula (Rodríguez González, *et al.*, 2010). Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> también pueden ser absorbidas por las superficies de las células de organismos fitoplanctónicos como *A. carterae*. Esto hace que aumenten su peso y, en condiciones naturales, acaben sedimentando hacia zonas afóticas. El estudio de Rodríguez González, *et al.*, (2010), comprobó que con una densidad de población equivalente a un *bloom* de la especie *A. carterae*, en presencia de nanocompuestos de TiO<sub>2</sub> de plata, se puede frenar la fase exponencial de la afloración en cuestión de minutos, para el caso de una marea roja. Por lo tanto, ante la problemática de los *blooms* tóxicos o HABs, la presencia de NPsAg, podría llegar a evitar el crecimiento del dinoflagelado. Además, la presencia de estas nanopartículas hace que se liberen grandes concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que puede reducir la tasa de crecimiento de los organismos que haya en sus alrededores (Navarro, *et al.*, 2008; Sendra, *et al.*, 2017a). En caso de *P. tricornutum*, estas nanopartículas de plata pueden hacer que alcance su EC50 con concentraciones de 143-184 µg/L (Sendra, *et al.*, 2017b). En este estudio, *P. tricornutum* no ha alcanzado el EC50 (18.37±8.25 %), ya que la concentración utilizada de NPsAg queda por debajo de los utilizados por Sendra, *et al.*, (2017b). Se puede decir, basándonos en las explicaciones anteriores, que, si en el medio natural se da una contaminación por NPsAg, es posible que *P. tricornutum* sea la especie dominante, ya que, aunque a *R. baltica* tampoco le afecten las NPsAg, la tasa de crecimiento de *P. tricornutum* seguirá siendo mayor. Por lo tanto, las NPsAg pueden alterar el curso natural del crecimiento de poblaciones fitoplanctónicas convivientes de otra forma.

También el mecanismo de alteración del transporte de electrones de las membranas celulares puede ser alterado por algunos metales, como por ejemplo los que fueron empleados en el estudio (Cu y Cd), y que pueden afectar negativamente a la realización de la fotosíntesis (Miao, *et al.*, 2005). Este estudio, en el que *Synechococcus sp.* es la especie



que menos crece en presencia del cobre, puede compararse con otros anteriores (Miao, *et al.*, 2005; Brand, *et al.*, 1986), en los que esta cianobacteria también aparece como la más sensible a este metal. Sin embargo, hay una diferencia en la especie más resistente. En estudios previos la especie más resistente corresponde a una especie de diatomea, mientras que, en el presente trabajo, al haber incluido una Cryptophyta (*R. baltica*), la especie más resistente no ha coincidido. Esto puede ser debido a que ninguno de los dos estudios previos incluyó una Cryptophyta y, por lo tanto, no se observó qué efecto tenía el cobre sobre este grupo algal y, además, tampoco se tuvieron en cuenta el contenido total de Cu y Cd como se ha hecho en este trabajo, sino el de los iones libres de cada metal. En cualquier caso, *Synechococcus sp.* ha resultado ser la especie más sensible, tal vez por su reducido tamaño. Esto implica que su ratio área/volumen es mayor que el del resto de especies, por lo tanto, sería más eficiente acumulando estos metales en su interior, lo que le lleva a ser la especie que más potencial de bioacumulación tiene (Miao, *et al.*, 2005), efecto que luego afectaría a niveles superiores en las redes tróficas. Como segunda justificación de los resultados obtenidos, y como ya sugirieron Brand, *et al.*, (1986), los metales tienen más afinidad para unirse a la membrana celular de un organismo procariota, compuesto por mucopolisacáridos (Brand, *et al.*, 1986), es decir, a *Synechococcus sp.*, ya que es el único organismo fitoplanctónico procariota utilizado en este estudio. Por otro lado, la presencia de cobre puede crear una alteración de las interacciones entre especies. En este caso, se puede explicar entendiendo que hay especies mixotróficas, que en este caso son *A. carterae* y *R. baltica*, que pueden cambiar su condición de fotoautótrofas por heterótrofas, obteniendo nutrientes de la absorción de sustratos orgánicos disueltos o por fagotrofia, utilizando reservas de nutrientes orgánicos (Burkholder, *et al.*, 2008). Esta característica permite a estas dos especies, presentar una capacidad de competencia interespecífica mayor que por ejemplo *Synechococcus sp.* y *P. tricornutum* en presencia de un factor que provoque una inhibición de la fotosíntesis, como es el caso del cobre. Este hecho quedaría corroborado con los resultados obtenidos, ya que los porcentajes de inhibición en presencia del Cu para estas dos últimas especies son significativos. La resistencia de las Cryptophytas al cobre, sumado a su dominancia en el medio natural durante el invierno en comparación con otras especies fitoplanctónicas dada su resistencia a las bajas temperaturas, hace que el crecimiento de este grupo se pueda ver favorecido y que se pueda provocar un afloramiento. Esto sucede debido a su tolerancia a las bajas temperaturas y a las situaciones de poca luz (Hammer & Pitchford, 2006). En este caso, durante el invierno y con las cuatro especies conviviendo en el medio natural, ante un aporte extra de cobre en el medio, se puede decir que *R. baltica* será la que

mejor se adaptaría. El cadmio, al contrario que el cobre (Tabla 3), no produjo ninguna reducción significativa de los porcentajes de inhibición para ninguna de las cuatro especies. Esto puede deberse a que el cadmio no tiene un efecto tan claro sobre los procesos bioquímicos microalgales, no siendo un factor ecológico importante cuando las aguas marinas no están contaminadas, mientras que las concentraciones naturales de cobre si lo son (Brand, *et al.*, 1986).

Al contrario que lo ocurrido con el resto de contaminantes, la interacción de los PUAs con esta comunidad fitoplanctónica marina mixta es diferente, ya que no depende de un aporte antropogénico de una sustancia, sino que las altas concentraciones de estos compuestos se dan cuando se produce un afloramiento en el medio natural de una especie de diatomea capaz de producir PUAs (como la especie *Thalassiosira rotula*). Cuando alcanzan la fase exponencial del crecimiento de la población en la que la biomasa es máxima, los nutrientes como el N y el P comienzan a ser un factor limitante. Es entonces cuando se produce la lisis celular de estas diatomeas y por lo que aumenta la producción de los PUAs hasta 10.7 veces más (en ausencia de N), y 4.6 veces más (en ausencia de P) (Ianora & Miralto, 2010). Sin embargo, *P. tricornutum*, que pertenece a las diatomeas, no produce PUAs (Pohnert, *et al.*, 2002, Ianora & Miralto, 2010) y, por lo tanto, la presencia de los aldehídos poliinsaturados hace que sea hipersensible a concentraciones que son subletales para otras especies. También, algunas oxilipinas son capaces de regular la velocidad a la que *Synechococcus sp.* crece, ya que su tasa de crecimiento es muy alta, y en presencia de estos compuestos, se ralentiza, pero sin llegar a frenarla del todo, como corroboran los datos de las tasas de crecimiento de la cianobacteria en los medios de cultivo experimentales (Tabla 1 y Tabla 2). Los PUAs pueden afectar a la capacidad fotosintética de cianobacterias como *Synechococcus sp.* (Ianora & Miralto, 2010) y, dado que las cianobacterias son fotoautótrofas, su tasa de crecimiento puede verse disminuida. Por último, se puede deber a que distintos PUAs mezclados, pueden mostrar un efecto antibacteriano sinérgico (Ribalet, *et al.*, 2008) y en este estudio se han mezclado tres tipos de PUAs: heptadienal, octadienal y decadienal. Para una situación de coexistencia en el medio acuático costero y extrapolando los resultados *in situ* al medio natural, es posible que la liberación de PUAs, tenga un importante papel en el control de la estructura de poblaciones de distintas cianobacterias, especialmente, durante los *blooms* de diatomeas productoras de estos compuestos oxidados (Ribalet, *et al.*, 2008). De todos modos, hay que tener en cuenta que *P. tricornutum* no es una especie que dé lugar a *blooms* frecuentes (Ianora, *et al.*, 2011). Sin embargo, especies

de diatomeas como las pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia*, son capaces de producir ácido domoico, una toxina que podría llegar a producir un efecto tóxico a los seres humanos, a través de la red trófica (Anderson, *et al.*, 2021).

Es también importante saber que las tasas de crecimiento bajas, se asocian a especies que suelen dar lugar a blooms tóxicos, aunque no solamente depende de esta característica. Para los dinoflagelados la tasa obtenida oscilaba entre 0.1 y 2.7 día<sup>-1</sup> (Smayda, 1997). Esto se asocia a los resultados de las tasas de crecimiento, ya que el dinoflagelado *A. carterae* es capaz de producir blooms tóxicos y es la especie con la tasa de crecimiento más baja de las cuatro especies del ensayo de toxicidad *in situ*, correspondiéndole una tasa que se encuentra dentro de los valores del estudio de Smayda, (1997). Este hecho, refuerza la asociación de blooms tóxicos y bajas tasas de crecimiento de los organismos.

Entre las interacciones entre especies, no ha destacado la competitividad de *Synechococcus sp.* ya que se ha visto desfavorecida en presencia de la mayoría de contaminantes. Pero, cabe destacar que esta cianobacteria es potencialmente tóxica y alelopática, es decir, que es capaz de liberar sustancias extracelulares potencialmente tóxicas para otros organismos (Hammer & Pitchford, 2006). Es cierto que, en otros estudios, hay atisbos de este efecto alelopático de *Synechococcus sp.* después de una semana en contacto con otras especies (*in situ*) (Sliwinska, *et al.*, 2017), de tal manera que podría ser, que este experimento haya resultado demasiado corto como para observar una competencia con el resto de especies por parte de la cianobacteria. No obstante, esta alelopatía puede ser responsable de que el género *Synechococcus* sea la especie protagonista de los blooms de cianobacterias en un 80% (Sliwinska, *et al.*, 2017). Estos blooms se conocen como CyanoHAB y son más frecuentes en verano, cuando la radiación solar y las temperaturas alcanzan su máximo. Estas condiciones hacen que las cianobacterias migren en la vertical regulando su flotabilidad, y que sean capaces de acceder a la luz solar durante el día para la realización de la fotosíntesis, mientras que, durante la noche, acceden a los nutrientes a cierta profundidad. Esta capacidad de regulación de la flotabilidad también les aporta una ventaja ecológica en el medio marino, frente a otras especies que no sean capaces de moverse en la vertical de la columna de agua (Paerl, *et al.*, 2018).

Para finalizar, se puede decir que, con todo lo argumentado anteriormente y la manera de testar los efectos que tienen los contaminantes cada uno por separado, para esta comunidad fitoplanctónica marina mixta la presencia de estos contaminantes tipo afecta a la dinámica poblacional en comparación con una situación de condiciones sin contaminación.

Dado que, en el medio natural los contaminantes se encuentran mezclados, posiblemente, se mantenga esta tendencia de cambio de las dinámicas poblacionales de las especies fitoplanctónicas convivientes en el medio natural, junto con las consecuencias negativas que todo ello conlleva.

Ante la posible aplicación de estos resultados al medio marino costero, y sabiendo que la población de *Synechococcus sp.* es la más sensible a los contaminantes utilizados en este estudio, se propone utilizarla como especie indicadora de una posible contaminación en el ecosistema marino costero, como ya han hecho otros autores con otros organismos sensibles como *Cylindrotheca closterium* (Araújo, *et al.*, 2010). De tal forma que, si se hace un seguimiento de su densidad de población, y esta, disminuye bruscamente, puede deberse tanto a la presencia de otras especies más competitivas en las condiciones que se den en un momento determinado (aporte extra de nutrientes, que permitan la aparición de un *bloom*), o a la presencia de contaminantes. En cualquier caso, haciendo una monitorización continuada en el tiempo de esta especie, se podrían predecir las variaciones de densidades de las distintas poblaciones convivientes en la costa, y, por lo tanto, estar prevenidos ante una situación de HAB o de contaminación por sustancias procedentes de las actividades humanas, sin ser confundidas con las variaciones de la densidad de población debido a causas naturales, como el cambio de las estaciones anuales.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere seguir la línea experimental de cultivos *in situ* de organismos fitoplanctónicos marinos mixtos. Por un lado, para ver las interacciones entre las distintas especies que conviven en el ecosistema marino costero, y, por otro lado, para establecer la relación de las poblaciones una vez mezcladas, con cada uno de los contaminantes. Esto se propone debido a que, después de la revisión bibliográfica, se ha observado que la mayoría de artículos se centran en la interacción de un contaminante para una única especie, de modo que hay escasa información de las interacciones interespecíficas relacionadas a la presencia de contaminantes.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se resumen a continuación:

1. En una población experimental fitoplanctónica mixta, las especies que más crecen en condiciones naturales son *P. tricornutum* y *Synechococcus sp.*, excluyendo competitivamente a *R. baltica* y *A. carterae*.
2. De todos los contaminantes ensayados, las NPsAg son las que han resultado más nocivas a las concentraciones ensayadas, alcanzando los mayores porcentajes de inhibición para *A. carterae* y *Synechococcus sp.*
3. El cadmio no ha afectado significativamente a ninguna de las cuatro especies estudiadas, a las concentraciones ensayadas.
4. La ciprofloxacina, para la concentración ensayada, favorece el crecimiento de *A. carterae*, pudiendo inducir la generación de proliferaciones de esta especie de dinoflagelado.
5. *R. baltica* es la especie más resistente de las cuatro utilizadas para los seis contaminantes tipo, ya que no se ha visto afectada significativamente por ninguno de ellos a las concentraciones utilizadas.
6. *Synechococcus sp.* es la especie más sensible de las cuatro especies del ensayo de toxicidad. Es por este motivo por el que esta especie puede ser empleada como indicadora de contaminación.
7. Se ha visto un claro efecto de los contaminantes en las tasas de crecimiento de estas cuatro especies fitoplanctónicas, por lo que se puede deducir, que la presencia de estos contaminantes en el medio marino costero, podría alterar la abundancia natural y composición fitoplanctónica del entorno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. M, Fensin, E., Gobler, C. J., Hoeglund, A.E., Hubbard, K. A., Kulis, D. M., Landsberg, J. H., Lefebvre, K. A., Provoost, P., Richlen, M. L., Smith, J. L., Solow, A. R. & Trainer, V. L. (2021). Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status and future trends. *Harmful Algae*, 102, 101975. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101975>
- Anfuso, E., Debelius, B., Castro, C.G., Ponce, R., Forja, J. M. & Lubian, L. M. (2013). Seasonal evolution of chlorophyll-a and cyanobacteria (*Prochlorococcus* and *Synechococcus*) on the northeast continental shelf of the Gulf of Cádiz: relation to thermohaline and nutrients fields. *Scientia Marina*, 77, 25-36. <https://doi.org/10.3989/scimar.03730.27A>
- Araújo, C. V. M., Díaz, F. R., Lubián, L. M., Blasco, J. & Moreno Garrido, I. (2010). Sensitivity of *Cylindrotheca closterium* to copper: Influence of three test endpoints and two test methods. *Science of the Total Environment*, 408 (17), 3696-3703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.012>
- Arias, A. H., Souissi, A., Glippa, O., Roussin, M., Dumoulin, D., Net, S., Ouddane, B. & Souissi, S. (2017). Removal and Biodegradation of Phenanthrene, Fluoranthene and Pyrene by the Marine Algae *Rhodomonas baltica* Enriched from North Atlantic Coasts. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98, 392-399. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1967-4>
- Baho, D. L., Pomati, F., Leu, E., Hessen, D. O., Moe, S. J., Norberg, J. & Nizzetto, L. (2019). A single pulse of diffuse contaminants alters the size distribution of natural phytoplankton communities. *Science of the Total Environment*, 683, 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.229>
- Balls, P. W. (2003). Copper, lead and cadmium in coastal waters of the western North Sea. *Marine Chemistry*, 15 (4), 363-378. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(85\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0304-4203(85)90047-7)
- Bérard, A. & Benninghoff, C. (2001). Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere*, 45 (4-5), 427-437. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00063-7)

- Biel Maeso, M., Baena Nogueras, R.M., Corada Fernández, C. & Lara Martín, P.A. (2018). Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 612, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.279>
- Blanck, H., Wängberg, S.A. & Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance—A New Ecotoxicological Tool. En Cairns, J. & Pratt, J. (Eds.), *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals* (pp. 219-230). ASTM International. <https://doi.org/10.1520/STP26265S>.
- Blasco, J., Hampel, M., Campana, O. & Moreno Garrido, I. (2017). Biological Effects of Pharmaceuticals in Marine Environment. En García Barrera T. & Gómez Ariza, J. L. (Eds.), *Environmental Problems in Marine Biology. Methodological Aspects and Applications* (pp. 318-348). CRC Press.
- Borowitzka, M. A. (2018). Chapter 3 - Biology of Microalgae. Microalgae. En Levine, I. A. & Fleurence, J. (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23-72). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Brand, L.E., Sunda, W.G. & Guillard, R. R. L. (1986). Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96 (3), 225-250. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90205-4)
- Burkholder, J. M., Glibert, P. M. & Skelton, H. M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic Waters. *Harmful Algae*, 8 (1), 77-93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.010>
- Casas, B., Varela, M., Canle, M., González, N. & Bode, A. (1997). Seasonal Variations of Nutrients, Seston and Phytoplankton, and Upwelling Intensity off La Coruña (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44 (6), 767-778. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0155>
- Chávez Andrade, G. M., Tanomaru Filho, M., Basso Bernardi, M<sup>a</sup>. I., De Toledo Leonardo, R., Faria, G. & Gierreiro Tanomaru, J. M<sup>a</sup>. (2019). Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Archives of Oral Biology*, 107, 104481. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104481>

- Comeau, F., Surette, C., Brun, G.L. & Losier, R. (2008). The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of The Total Environment*, 396 (2-3), 132–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.031>
- Cuenca Rompinelli, M. T. (2019). *Contaminantes emergentes: origen y destino*. [Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Alcalá].
- De Martino, A., Meichenin, A., Kehou Pan, J. S. & Bowler, C. (2007). Genetic and Phenotypic Characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) Accessions. *Journal of Phycology*, 43, 992-1009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x992>
- Del Real Olvera, J. (2019). Adsorption and kinetic studies of the removal of ciprofloxacin from aqueous solutions by diatomaceous earth. *Desalination and Water Treatment*, 162, 331-340. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.24313>
- Dionis Joachim, L. (2017). *Uptake and effects of microplastic particles in selected marine microalgae species; Oxyrrhis marina and Rhodomonas baltica*. [Tesis Doctoral, Norwegian University of Science and Technology].
- Dulio, V., Bavel, B. V., Brorström Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., Thomas, K. & Koschorreck, J. (2018). Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe*, 30 (5). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0135-3>
- Echeveste, P., Agustí, S. & Dachs, J. (2011). Cell size dependence of additive versus synergetic effects of UV radiation and PAHs on oceanic phytoplankton. *Environmental Pollution*, 159 (5), 1307-1316. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.023>
- Echeveste, P., Agustí, S. & Tovar Sánchez, A. (2012). Toxic thresholds of cadmium and lead to oceanic phytoplankton: Cell size and ocean basin–dependent effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (8), 1887-1894. <https://doi.org/10.1002/etc.1893>



- European Comission, EU Science Hub. (2018) *Updated Surface wáter Watch List adopted by the Commission*. <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/updated-surface-water-watch-list-adopted-commission>
- Falkowski, P.G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*, 39, 235-258. <https://doi.org/10.1007/bf00014586>.
- Feo, M<sup>a</sup>. L., Begnati, R., Passoni, A., Riva, F., Salvagio Manta, D., Sprovieri, M., Traina, A., Zuccato, E. & Castiglioni S. (2020). Pharmaceuticals and other contaminants in waters and sediments from Augusta Bay (southern Italy). *Science of the Total Environment*, 739, 139827. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139827>
- Gárate Lizárraga, I. (2012). Proliferation of *Amphidinium carterae* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) in Bahía de La Paz, Gulf of California. *CICIMAR Oceánides*, 27 (2), 37-49. <http://dx.doi.org/10.37543/oceanides.v27i2.115>
- Gárate Lizárraga, I., González Armas, R., Verdugo Díaz, G., Okolodkovb, Y., Pérez Cruz, B. & Díaz Ortíz, J. (2019). Seasonality of the dinoflagellate *Amphidinium cf. carterae* (Dinophyceae: Amphidinales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 532-541. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.073>
- Garrido, E., Camacho Muñoz, D., Martín, J., Santos, A., Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. (2016). Monitoring of emerging pollutants in Guadiamar River basin (South of Spain): analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 25127–25144. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7759-x>
- Gomes, T., Almeida, A. C. & Georgantzopoulou, A. (2020). Characterization of cell responses in *Rhodomonas baltica* exposed to PMMA nanoplastics. *Science of the Total Environment*, 726, 138547. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138547>
- Gordon, G., Cameron, J., Gupta, S., Engstrom, M., Reed, J. & Pfleger, B. (2020). Genome-Wide Analysis of RNA Decay in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. *American Society for Microbiology*, 5 (4), e00224-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00422-20>

- Greenwood Jones, K. (2007). *Applications of radiation chemistry to understand the fate and transport of emerging pollutants of concern in coastal Waters*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Carolina del Norte].
- Guillard, R.R.L. & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms, *I. Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2021). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>.
- Hammer, A. C. & Pitchford, J. W. (2006). Mixotrophy, allelopathy and the population dynamics of phagotrophic algae (cryptophytes) in the Darss Zingst Bodden estuary, southern Baltic. *Marine Ecology Progress Series*, 328, 105-115. <https://doi.org/10.3354/meps328105>
- Hernández Becerril, D.U. (2014). Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 44-53. <https://doi.org/10.7550/rmb.32037>
- Hulburt, E.M. (1957). The taxonomy of unarmored Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *Biological Bulletin*, 112, 196-219.
- Ianora, A., Bentley, M.G., Caldwell, G. S., Casotti, R., Cembella, A. D., Engström-Öst, J., Halsband, C., Sonnenschein, E., Legrand, C., Llewellyn, C. A., Paldavicienė, A., Pilkaityte, R., Pohnert, G., Razinkovas, A., Romano, G., Tillmann, U. & Vaiciute, D. (2011). The Relevance of Marine Chemical Ecology to Plankton and Ecosystem Function: An Emerging Field. *Marine Drugs*, 9 (9), 1625-1648. <https://doi.org/10.3390/md9091625>
- Ianora, A. & Miralto, A. (2010). Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: a review. *Ecotoxicology*, 19, 493–511. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0434-y>

- Kooistra, W.H.C.F., Gersonde, R., Medlin, L. K. & Mann, D. G. (2007). Chapter 11 - The Origin and Evolution of the Diatoms: Their Adaptation to a Planktonic Existence. En Falkowski, P. G. & Knoll, A. H. (Eds.), *Evolution of Primary Producers in the Sea* (pp. 207-249). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50012-6>
- Lawrence, J. R., Zhu, B., Swerhone, G. D. W., Roy, J., Tumber, V., Waiser, M. J., Topp, E. & Korber, D. R. (2011). Molecular and Microscopic Assessment of the Effects of Caffeine, Acetaminophen, Diclofenac and Their Mixtures on River Biofilm Communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (3), 508-517. <https://doi.org/10.1002/etc.1723>
- Lewin, J. C. (1958). The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology Society*, 18 (2), 427-482.
- Liu, C.L., Place, A. R. & Jagus, R. (2017). Use of Antibiotics for Maintenance of Axenic Cultures of *Amphidinium carterae* for the Analysis of Translation. *Marine Drugs*, 15 (8), 242. <https://doi.org/10.3390/md15080242>
- Liu, Y., Alessi, D. S., Owttrim, G. W., Petrash, D. A., Mloszewska, A. M., Lalonde, S. V., Martinez, R. E., Zhou, Q. & Konhauser, K. O. (2015). Cell surface reactivity of *Synechococcus* sp. PCC 7002: Implications for metal sorption from seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 169, 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.07.033>
- Lopes de Sousa, M., Alves Cursino dos Santos, D. Y, Chow, F. & Martins Pompêo, M. L. (2021). Caffeine as a contaminant of periphyton: ecological changes and impacts on primary producers. *Ecotoxicology*, 30, 599-609. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02381-x>
- Ludwig, M. & Bryant, D. A. (2012). Acclimation of the global transcriptome of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 to nutrient limitations and different nitrogen sources. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00145>
- Mass, E. W., Latter, R. M., Thiele, J., Waite, A. M., Heather, J. & Brooks L. (2007). Effect of multiple antibiotic treatments on a paralytic shellfish toxin-producing culture of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 48, 255–260. <https://doi.org/10.3354/ame048255>

- Marasini, S., Swift, S., Dean, S. J., Ormonde, S. E. & Craig, J. P. (2016). Spectrum and sensitivity of bacterial keratitis isolates in Auckland. *Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1155/2016/3769341>
- Miao, A., Wang, W. & Juneau, P. (2005). Comparison of Cd, Cu and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (10), 2603–2611. <https://doi.org/10.1897/05-009R.1>
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S. A., Ianora, A., Russo, G. L., Buttino, I., Mazzearella, G., Laabir, M., Cabrini, M. & Giacobbe, M. G. (1999). The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402, 173-176. <https://doi.org/10.1038/46023>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A., Quigg, A., Santschi, P.H., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Navarro Gómez, S. y Suárez Gómez, A. (2019). *Evaluación in – silico de la estructura y función de la proteína hipotética B7FQK1 de Phaeodactylum tricornutum*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad Libre]. Repositorio de la Universidad Libre de Colombia. <https://hdl.handle.net/10901/17781>
- Nayak, B. B., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (1997). Influence of bacteria on growth and hemolysin production by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Marine Biology*, 130, 35-39. <https://doi.org/10.1007/s002270050222>
- Nelson, W.A., Neill, K.F. & D'Archino, R. (2015). When seaweeds go bad: an overview of outbreaks of nuisance quantities of marine macroalgae in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 49 (4), 472-491. <https://doi.org/10.1080/00288330.2015.1064975>
- Nyholm, N. (1990). Expression of Results from Growth Inhibition Toxicity Tests with Algae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19, 518-522. <https://doi.org/10.1007/BF01059070>
- OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development). (1984). OECD Guideline for Testing of Chemicals: Alga, and Growth Inhibition Test.

- Ojeda Rodríguez, A. (1976). *Influencia de algunos nutrientes en Thalassiosira fluviatilis e importancia de la luz en Phaeodactylum tricornutum*. [Trabajo de fin de grado, Universidad de La Laguna].
- Paerl, H. W., Otten, T. G & Kudela, R. (2018). Mitigating the expansión of harmful algal blooms across the freshwater-to-marine continuum. *Environmental Science & Technology*, 52, 5519-5529. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950>
- Paíga, P. & Delerue Matos, C. (2017). Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. *Marine Pollution Bulletin*, 120 (1-2), 355-363. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.030>
- Palacios Bohórquez, D. E. (2016). *Efecto de los espectros de luz azul, roja y verde en la multiplicación celular y síntesis bioquímica de Rhodomonas spp. y Tetraselmis spp. en condiciones in vitro*. [Tesis Doctoral, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Institucional de la Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/13308>
- Peña Guzmán, C., Ulloa Sanchez, S., Mora, K., Helena Bustos, R., López Barrera, E., Alvarez, J. & Rodríguez Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 273, 408-423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Philips, E.J., Badylak, S., Lasi, M.A., Chamberlain, R., Green, W. C., Hall, L. M., Hart, J. A., Lockwood, J. C., Miller, J. D., Morris, L. J. & Steward, J. S. (2015). From Red Tides to Green and Brown Tides: Bloom Dynamics in a Restricted Subtropical Lagoon Under Shifting Climatic Conditions. *Estuaries Coasts*, 38, 886–904. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9874-6>
- Pichierri, S., Pezzolesi, L., Vanucci, S., Totti, C. & Pstocchi, R. (2016). Inhibitory effect of polyunsaturated aldehydes (PUAs) on the growth of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Aquatic Toxicology*, 179, 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.018>

- Pohnert, G., Lumineau, O., Cueff, A., Adolph, S., Cordevant, C., Lange, M. & Poulet, S. (2002). Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods? *Marine Ecology Progress Series*, 245, 33-45. <https://doi.org/10.3354/meps245033>
- Ribalet F., Intertaglia L., Lebaron P. & Casotti R. (2008). Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. *Aquatic Toxicology*, 86 (2), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.005>
- Richmond, E.K., Grace, M. R., Kelly, J. J., Reisinger, A. J., Rosi, E. J. & Walters, D. M. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are ecological disrupting compounds (EcoDC). *Elementa: Science of the Anthropocene.*, 5. <https://doi.org/10.1525/elementa.252>
- Rodríguez González, V., Obregón Alfaro, S., Torres Martínez, L. M., Cho, S.H. & Lee, S. W. (2010). Silver–TiO<sub>2</sub> nanocomposites: Synthesis and harmful algae bloom UV-photoelimination. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98 (3-4), 229-234. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.06.001>
- Rosales Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C. y Morales, E. (2008). Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Revista de Biología Tropical*, 56.
- Ruoco Molina, M. (2011). *Mecanismos genéticos y estrategias adaptativas de productores primarios (microalgas y cianobacterias) en un escenario de cambio global*. [Tesis doctoral, Universidad Complutense].
- Santos Merino, M<sup>a</sup>. C. (2017). *Ingeniería metabólica de *Synechococcus elongatus* PCC 7942*. [Tesis Doctoral, Universidad de Cantabria].
- Seabra Pereira, C. D., Maranhão, L. A., Cortez, F. S., Pusceddu, F. H., Santos, A. R., Ribeiro, D. A., Cesar, A. & Guimarães, L. L. (2016). Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment* 548–549, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>

- Sendra M., Sánchez Quiles D., Blasco J., Moreno Garrido I., Lubián L.M., Pérez García S. y Tovar Sánchez A. (2017a). Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. *Environment International*, 98, 62-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.024>
- Sendra, M., Yeste, M. P., Gatica, J. M., Moreno Garrido, I. & Blasco, J. (2017b). Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere*, 179, 279-289. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.123>
- Silviera Alves, G.E. (1998). Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Simidu, U., Austrio, K. & Kaneko, E. (1971). Bacterial flora of phyto and zooplankton in inshore water of Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, 17, 1157-1160. <https://doi.org/10.1139/m71-184>
- Sliwinska Wilczewska, S., Maculewicz, J., Tuszer, J., Dobosz, K., Kulasa, D. & Latała, A. (2017) First record of allelopathic activity of the picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on a natural plankton community. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 17, 227-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecohyd.2017.05.001>
- Smayda, T. J. (1997). Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42 (5), 1137-1153. [https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5\\_part\\_2.1137](https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1137)
- Sournia, A., Lassus, P., Arzul, G., Erand, E., Gentien, P. & Marcaillou, C. (1995). Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into diversity. *Harmful Marine Algal Blooms*, 103-112.
- Tambi, H., Fonnes Flaten, G. A., Egge, J. K., Bodtker, G., Jacobsen, A. y Thingstad, T. F. (2009). Relationship between phosphate affinities and cell size and shape in various bacteria and phytoplankton. *Aquatic Microbiology Ecology*, 57, 311-320. <https://doi.org/10.3354/ame01369>
- Thome Coppo, N. J. (2009). Integral curvilínea aproximada de un campo vectorial sobre una curva. Universitat Politècnica de València. <https://riunet.upv.es/handle/10251/5602>

- Tolotti, M., Thies, H., Cantonati, M., Hansen, C. M. E. & Thaler, B. (2003). Flagellate algae (Chrysoohycae, Dinophyceae, Cryptophyceae) in 48 high mountain lakes of the Northern and Southern slope of the Eastern Alps: biodiversity, taxa distribution and their driving variables. *Hydrobiologia*, 502, 331-348. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.00000004291.03882.f7>
- Tovar Sánchez, A., Sánchez Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., Moreno Garrido, I. & Blasco, J. (2013). Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters. *PLOS ONE*, 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065451>
- Tukaj, S. & Tukaj, Z. (2009). Distinct chemical contaminants induce the synthesis of Hsp70 proteins in green microalgae *Desmodesmus subspicatus*: Heat pretreatment increases cadmium resistance. *Journal of Thermal Biology*, 35, 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.05.007>
- US-EPA (2008). *Draft White paper: Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern – part I: General Challenges and Recommendations*. United States Environmental Protection Agency, OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, Washington, DC.
- Vidoudez, C., Casotti, R., Bastianini, M. & Pohnert, G. (2011). Quantification of Dissolved and Particulate Polyunsaturated Aldehydes in the Adriatic Sea. *Marine Drugs*, 9, 500-513. <https://doi.org/10.3390/md9040500>
- Wu, J., Yue, J., Hu, R., Yang, Z. & Zhang, L. (2008). Use of Caffeine and Human Pharmaceutical Compounds to Identify Sewage Contamination. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 96-102.
- You, X., Xu, N., Yang, X. & Sun, W. (2021). Pollutants affect algae-bacteria interactions: A critical review. *Environmental Pollution*, 276. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116723>
- Zhou, B., Ma, J., Chen, F., Zou, Y., Wei, Y., Zhong, H. y Pan, K. (2020). Mechanisms underlying silicon-dependent metal tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Pollution*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114331>



# ANEXOS

## Anexo I.

Watch list of substances for Union-wide monitoring as set out in Article 8b of Directive 2008/105/EC

Name of substance/group of substances	CAS number <sup>(1)</sup>	EU number <sup>(2)</sup>	Indicative analytical method <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>	Maximum acceptable method detection limit (ng/l)
17-Alpha-ethinylestradiol (EE2)	57-63-6	200-342-2	Large-volume SPE - LC-MS-MS	0,035
17-Beta-estradiol (E2), Estrone (E1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	SPE - LC-MS-MS	0,4
Macrolide antibiotics <sup>(5)</sup>			SPE - LC-MS-MS	19
Methiocarb	2032-65-7	217-991-2	SPE - LC-MS-MS or GC-MS	2
Neonicotinoids <sup>(6)</sup>			SPE - LC-MS-MS	8,3
Metaflumizone	139968-49-3	604-167-6	LLE - LC-MS-MS or SPE - LC-MS-MS	65
Amoxicillin	26787-78-0	248-003-8	SPE - LC-MS-MS	78
Ciprofloxacin	85721-33-1	617-751-0	SPE - LC-MS-MS	89

<sup>(1)</sup> Chemical Abstracts Service

<sup>(2)</sup> European Union number – not available for all substances

<sup>(3)</sup> To ensure comparability of results from different Member States, all substances shall be monitored in whole water samples.

<sup>(4)</sup> Extraction methods:

LLE — liquid liquid extraction

SPE — solid-phase extraction

Analytical methods:

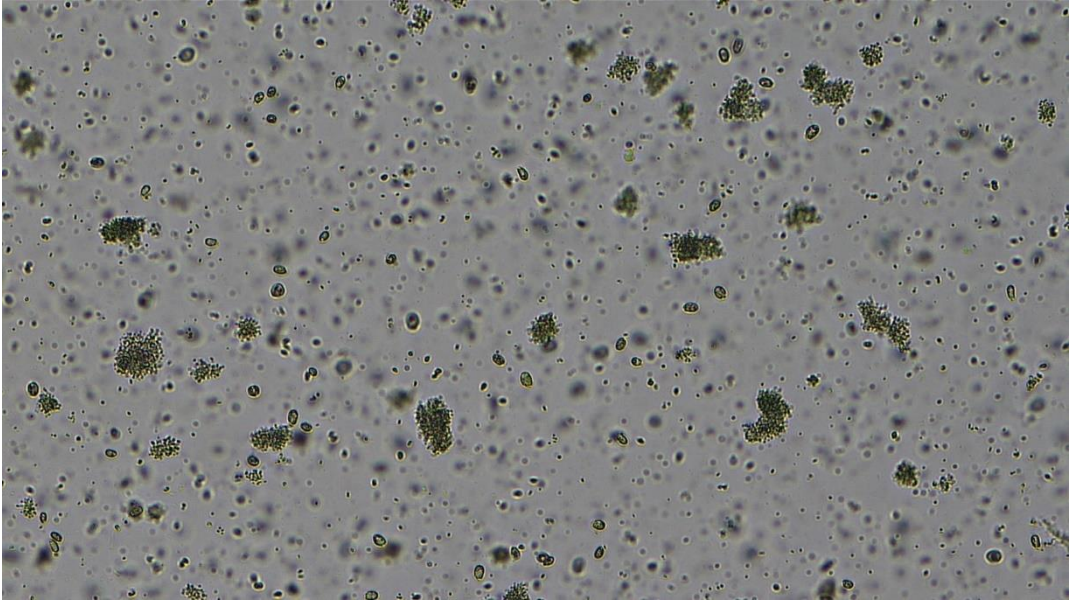
GC-MS — Gas chromatography-mass spectrometry

LC-MS-MS — Liquid chromatography (tandem) triple quadrupole mass spectrometry

<sup>(5)</sup> Erythromycin (CAS number 114-07-8, EU number 204-040-1), Clarithromycin (CAS number 81103-11-9), Azithromycin (CAS number 83905-01-5, EU number 617-500-5)

<sup>(6)</sup> Imidacloprid (CAS number 105827-78-9/ 138261-41-3, EU number 428-040-8), Thiacloprid (CAS number 111988-49-9), Thiamethoxam (CAS number 153719-23-4, EU number 428-650-4), Clothianidin (CAS number 210880-92-5, EU number 433-460-1), Acetamiprid (CAS number 135410-20-7/160430-64-8)

## Anexo II



**Figura 9.** *A. carterae* y *Synechococcus* sp. sin agregar y agregadas, donde se puede apreciar la diferencia de tamaño entre ambas especies.

### Anexo III

Composición del medio f/2 para enriquecer el agua de los cultivos stocks (Guillard y Ryther, 1962)

Medio f/2 con el doble de concentración de nitrato y fosfato.

Componentes básicos para las disoluciones stocks.

$\text{NO}_3\text{Na}$	75 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.4 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.6 g

Disolver en aproximadamente 300 mL de agua desionizada y autoclavada. Cuando se enfríe, añadir:

0.5 mL de disolución de metales traza (Sol. 1)

50 mL de disolución de vitaminas (Sol. 2)

Llevarlo a 500 mL de agua desionizada. Guardarlo a 4°C en la oscuridad. Para cada litro de cultivo, hay que añadir 1 mL de la disolución.

Disolución 1 (metales traza):

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.80 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06 g

Llevarlo a un volumen final de 10 mL y guardarlo como una disolución stock en frío y oscuridad.

Disolución 2 (vitaminas):

Disolver 50 mg de vitamina B<sub>12</sub> y 1 g de vitamina B<sub>1</sub> en 500 mL de agua desionizada y filtrada por 0.22 µm, guardándolo como disolución stock en frío y oscuridad.

Disolución de silicatos (para los cultivos de diatomeas):

Disolver 3.7 mL de una disolución de silicatos pura (saturada\*) en 100 mL de agua desionizada y filtrada por 0.22  $\mu\text{m}$ , guardándola en frío y oscuridad. Para cada litro de cultivo, hay que añadir 1 mL de la disolución.

\*Nosotros utilizamos una disolución pura de silicatos de PANREAC, código 2111714.

## Anexo IV

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de cada especie en los controles. Son expresados como la media de la desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

% inhibición	Control	Control Metanol	Control DMSO
<i>R. baltica</i>	0,000 ± 11,974	0,000 ± 26,881	0,000 ± 9,264
<i>A. carterae</i>	0,000 ± 36,477	0,000 ± 35,561	0,000 ± 13,122
<i>P. tricornutum</i>	0,000 ± 1,428	0,000 ± 11,432	0,000 ± 4,911
<i>Synechococcus sp.</i>	0,000 ± 2,281	0,000 ± 5,434	0,000 ± 7,124

Comparación estadística (t-test para variables independientes) de los resultados de los porcentajes de inhibición de cada especie expuesta durante 72 h a cada contaminante, para los controles, sin ningún añadido (Control), con añadido en metanol (Control Metanol) para su comparación cuando estuvieron expuestas a los PUAs y con añadido en DMSO (Control DMSO), para la comparación cuando estuvieron expuestas a ciprofloxacina.